UNIVERSITÉ DE PARIS FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1948-1949 **Série E. N° 28**

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MÉTHODES QUANTITATIVES EN MICROBIOLOGIE

LA MÉTHODE DES DILUTIONS APPLIQUÉE A LA PÉNICILLINE

THESE

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie
(Doctorat d'Etat)

présentée et soutenue le 30 novembre 1948

PAR

Mlle Denise BENOIST

Pharmacien
Diplômée de Microbiologie-Parasitologie et de Chimie biologique
de la Faculté de Pharmacie de Paris

Jury..... { MM. M.-M. JANOT, Président
A. SARTORY, Professeur
Mlle S. LAMBIN, Maître de Conférences

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550017_0063

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MÉTHODES QUANTITATIVES EN MICROBIOLOGIE

LA MÉTHODE DES DILUTIONS APPLIQUÉE A LA PÉNICILLINE

UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1948-1949 **Série E. N° 28**

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MÉTHODES QUANTITATIVES EN MICROBIOLOGIE

LA MÉTHODE DES DILUTIONS APPLIQUÉE A LA PÉNICILLINE

THESE

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie
(Doctorat d'Etat)

présentée et soutenue le 30 novembre 1948

PAR

Mlle Denise BENOIST

Pharmacien
Diplômée de Microbiologie-Parasitologie et de Chimie biologique
de la Faculté de Pharmacie de Paris

Jury..... { MM. M.-M. JANOT, Président
A. SARTORY, Professeur
Mlle S. LAMBIN, Maître de Conférences

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

Administration

MM. R. FABRE, ✻, ✪ I., *Doyen.*
R. DELABY, *Assesseur.*
G. CUVIER, ✪ I., *Secrétaire.*
L. JEANDEL, ✪ I., *Rédacteur.*

Professeurs

MM.	FABRE, ✻, ✪ I.....	Toxicologie.
	DELABY, ✻, ✪ I.....	Pharmacie chimique.
	SARTORY, C. ✻, ✪ I.....	Microbiologie.
	PICON, ✻, ✪ I.....	Chimie minérale.
	MASCRE, ✻, ✪ I.....	Botanique.
	FLEURY, ✻, ✪ I.....	Chimie biologique.
	JANOT, ✪ I.....	Pharmacie galénique.
	CHARONNAT, ✪ I.....	Chimie organique.
	VALETTE, ✪ I.....	Zoologie appliquée.
	BEDEL, ✻, ✪ I.....	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
	PARIS.....	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
	GUILLOT.....	Physique.
	GAUTIER, ✪ I.....	Chimie analytique.
	RAOUL.....	Professeur sans chaire.
	DOMANGE ✪ I.....	Professeur sans chaire.
	CRETE.....	Professeur sans chaire.
	COURTOIS.....	Professeur sans chaire.

Doyen Honoraire : M. RADAIS, O. ✻, ✪ I.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Professeurs Honoraires

MM. DELEPINE, O. ✻, ✪ I. et LEBEAU, O. ✻, ✪ I., Membres de l'Institut
PERROT, C. ✻, ✪ I., COUTIERE, O. ✻, ✪ I.,
BOUGAULT, O. ✻, ✪ I., LUTZ, ✻, ✪ I.,
GORIS, O. ✻, ✪ I., HERISSEY, O, ✻, ✪ I.,
LAUNOY; O. ✻, ✪ I., SOMMELET, ✻, ✪ I.

Maîtres de Conférences

MM.	MORETTE.....	Sciences physiques et chimiques.
	CAVIER.....	Sciences naturelles.
Mlle	LAMBIN.....	Sciences naturelles.
MM.	TRUHAUT, ✻, ✪ I.....	Sciences physiques et chimiques.
	MOREAU.....	Sciences physiques et chimiques.

Chefs des travaux pratiques

MM.	CORRIEZ, ✪ I.....	Physique.
	HARISPE, travaux pratiques de 1re année.	Chimie générale et pharmaceutique.
	DEYSSON.....	Botanique.
	GERMAN.....	Microbiologie (Ch. de fonctions).
	GIRARD.....	Chimie biologique.
	MANGEOT.....	T. P. de 4e aunée.
	N.....	Biologie animale.
	N.....	Chimie analytique.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ✪ I.

Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, ✪ A.

A MES PARENTS

A MA SŒUR

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A notre Jury de Thèse :

A Monsieur le Professeur M.-M. JANOT

qui nous a fait le grand honneur de nous compter parmi ses élèves et d'accepter la présidence du jury de notre thèse.
Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Doyen A. SARTORY

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Commandeur de la Légion d'honneur

que nous assurons de notre vive gratitude pour les marques d'intérêt qu'il nous a prodiguées.

A Mademoiselle S. LAMBIN

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris

à qui nous adressons nos sincères remerciements pour son enseignement au cours de nos années d'études.

A Monsieur H. PÉNAU

Docteur ès-Sciences naturelles
Ancien Président de l'Académie de Pharmacie
Chevalier de la Légion d'Honneur

qui fut l'instigateur de ce travail et que nous ne saurions jamais assez remercier de ses conseils et de sa bienveillance.

« ...Dans les matières dont la preuve consiste en expériences et non en démonstrations, on ne peut faire aucune assertion universelle que par la générale énumération de toutes les parties et de tous les cas différents. »

PASCAL
(Fragment d'un traité du vide).

INTRODUCTION

Parmi les médicaments mis actuellement à la disposition du médecin, une place de plus en plus importante doit être faite aux antibiotiques. La mise au point de la pénicilline a ouvert une voie nouvelle à la thérapeutique par les produits biologiques. Après les grandes espérances soulevées par la chimiothérapie, notamment par les dérivés sulfamidés, espérances partiellement détruites par la résistance rapidement acquise de certaines souches microbiennes à ces produits, la découverte des antibiotiques, application récente d'une ancienne notion remontant à l'ère pastorienne, vient renforcer l'action des produits chimio-thérapeutiques de synthèse. Cette thérapeutique élargira encore ses possibilités quand seront au point, à côté de la Pénicilline, d'autres métabolites microbiens ou fongiques actifs contre les germes ne prenant pas le Gram et contre les acido-résistants.

Il est vraisemblable qu'il en sera pour les antibiotiques de même que pour d'autres corps comme les vitamines ou les hormones qui, d'abord préparés par la voie biologique, sont actuellement produits par synthèse. La différenciation des diverses Pénicillines, et l'étude de leur structure, l'annonce récente de leur préparation synthétique par V. du VIGNEAUD et ses collaborateurs (218, 218 bis), les travaux très poussés, d'ordre chimique, effectués sur d'autres antibiotiques comme la Gramicidine et la Streptomycine, laissent prévoir la possibilité de préparer les antibiotiques par la voie chimique, destinée à détroner la voie biologique actuellement utilisée. Cependant, du point de vue industriel, la complexité de cette synthèse et la nouveauté des réactions à mettre en jeu, qui doivent être infiniment moins brutales que dans les procédés de synthèse utilisés jusqu'à ce jour, peuvent faire supposer qu'économiquement parlant, la préparation par voie biologique sera encore longtemps la seule rentable. C'est alors qu'intervient la nécessité absolue d'avoir à sa disposition des méthodes précises de titrage, tant pour suivre les diverses phases de la production de l'antibiotique et pour contrôler le produit fini, que pour pouvoir diriger efficacement la thérapeutique, en s'assurant de la reproductibilité des mêmes effets, dans des circonstances données.

C'est pourquoi, ayant participé, depuis quatre ans, à de nombreuses recherches sur la production de divers antibiotiques, et notamment de la Pénicilline, sur les conseils de M. le Professeur M.M. JANOT, nous avons choisi pour sujet de notre thèse, l'étude du titrage de ce produit, et plus particulièrement la technique des dilutions, que nous avons eu l'occasion d'étudier et de pratiquer longuement, avant même que la reprise normale des relations scientifiques avec le monde anglo-saxon nous ait permis de recevoir une abondante bibliographie sur les techniques utilisées dans le titrage des antibiotiques. En effet, les travaux sur les titrages furent entrepris au Service des Recherches des Laboratoires ROUSSEL sous l'impulsion de Monsieur H. PENAU, d'abord pour le titrage de la Corylophylline, puis pour celui de la Pénicilline par une équipe de chercheurs qui mirent au point, à côté de la technique par dilution, les méthodes rapides par opacimétrie. Ce sont

nos recherches personnelles, dans ce domaine, que nous exposons ici. Le but que nous nous sommes efforcée d'atteindre a été la mise au point d'une méthode de titrage simple et pratique applicable industriellement et notre travail peut être divisé en trois parties d'inégale importance :

Le premier chapitre est un exposé rapide de la question des antibiotiques en général, historique, mise en évidence.

Dans le second chapitre, les différentes méthodes actuellement en usage pour le titrage de la Pénicilline sont brièvement passées en revue.

Le troisième chapitre, de beaucoup le plus important, décrit en détail le titrage par la méthode des dilutions et nos recherches personnelles à ce sujet.

C'est un devoir pour nous, au début de ce modeste travail, d'exprimer notre respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur M.M. JANOT, qui nous a fait le grand honneur d'accepter la Présidence de notre thèse.

Durant le cours de nos études, il a toujours été pour nous un guide éclairé; depuis quatre ans, et chaque fois que nous avons sollicité son avis sur ces questions qu'il connaît bien, il a sans cesse été prodigue de conseils judicieux. Nous ne saurions trop lui dire toute notre gratitude.

Il nous est également très agréable de remercier Monsieur le Professeur A. SARTORY et Mademoiselle S. LAMBIN, qui ont bien voulu accepter d'être juges de notre thèse.

Au cours de ces quatre années où nous nous sommes souvent heurtée aux difficultés de la recherche et de la mise au point d'une méthode de titrage applicable à l'industrie, nous avons été sans cesse inspirée et soutenue par Monsieur H. PENAU, Ancien Président de l'Académie de Pharmacie, Directeur Scientifique de la Société Française de la Pénicilline; son vaste savoir et sa grande expérience des problèmes industriels, joints à un esprit d'organisation et à des qualités de coeur connues de tous ses collaborateurs font de lui, pour nous comme pour tous nos camarades, le "Patron".

C'est également un agréable devoir pour nous de remercier Monsieur le Docteur-Vétérinaire VELU, Chef du Service des Recherches Bactériologiques de la Société Française de la Pénicilline; son immense documentation, mise au service d'une technique approfondie, nous a été d'un grand secours au cours de nos recherches qu'il n'a cessé de diriger.

Nous avons trouvé, auprès de nos camarades de travail, une franche amitié et une aide souvent précieuse. Nous les en remercions très amicalement.

PREMIÈRE PARTIE

LES ANTIBIOTIQUES - GÉNÉRALITÉS

I - DEFINITION

Etymologiquement, l'expression antibiotique signifie "qui s'oppose à la vie; qui inhibe la croissance". Le terme : "antibiosis" fut créé par S. VUILLEMIN (221) en 1889, pour désigner le phénomène général de la lutte entre 2 organismes vivants, l'agresseur étant nommé "antibiote". Le terme "antibiotique" désignant les substances chimiques elles-mêmes sécrétées par l'antibiote et produisant l'inhibition d'autres germes, semble avoir été introduit dans la littérature par S. A. WAKSMAN (222). Suivant l'intensité d'action de l'antibiotique sur un microorganisme donné, on peut reconnaître :

a) Une action bactériostatique (la multiplication du germe est inhibée, mais celui-ci n'est pas tué et, replacé dans des conditions favorables, il croît de nouveau).

b) Une action bactéricide.

c) Une action bactériolytique.

II - HISTORIQUE

Il est classique, dans la bibliographie anglo-saxonne, de faire remonter la découverte des antibiotiques à l'observation, désormais célèbre même dans le grand public, de A. FLEMING (45) : à la vérité, des faits analogues avaient été remarqués avant lui, et des essais d'extraction et d'application thérapeutique tentés avec divers produits antibiotiques, et il est probable que, sans d'une part les travaux des biochimistes de l'Ecole d'OXFORD, qui s'attachèrent à l'extraction de la Pénicilline, et d'autre part sans les circonstances qui firent que, du fait de la guerre, et de l'intérêt primordial qu'offrait la question, l'industrie américaine mit à la disposition des chercheurs des moyens d'une puissance inconnue jusqu'alors, l'observation de A. FLEMING serait restée dans le même oubli que celles de ses devanciers, et ses applications limitées à quelques techniques de laboratoire.

En réalité, l'étude des substances appelées aujourd'hui antibiotiques remonte à l'ère pastorienne, et constitue un aspect particulier du phénomène très général de l'antagonisme microbien.

C'est à L. PASTEUR et J. JOUBERT (153) qu'il faut remonter pour voir décrit, dès 1877, le phénomène de l'antagonisme microbien, observé à propos de Bacillus anthracis qui, si on

l'inocule en association, avec les bactéries banales du sol, ne provoque plus la mort, même chez des animaux très sensibles. PASTEUR ajoutait : "Ces faits justifient peut-être les plus grands espoirs du point de vue thérapeutique".

A la suite de cette observation, on peut citer les noms de nombreux chercheurs qui, non seulement observèrent des phénomènes analogues d'antagonisme entre des microorganismes variés, mais firent également des essais de titrage, d'extraction et d'application thérapeutique.

En 1885, V. BABES (6) démontre que, en milieu solide aussi bien qu'en milieu liquide, un germe est capable d'élaborer une substance inhibant la croissance d'un autre. La même année, A. CATANI (24) étudie l'action de Bacterium termo et fait même des essais de traitement de la tuberculose pulmonaire par insufflation dans les poumons d'une culture de ce germe. En 1887, C. GARRE (61) étudie l'action de B. fluorescens sur les Staphylocoques pyogènes, DOEHLE (35) dans une thèse publiée en 1889, étudie l'action sur le bacille du charbon, de "Micrococcus anthracotoxicus".

Puis viennent les travaux sur les produits sécrétés par le bacille pyocyanique : ceux de Ch. BOUCHARD en 1889 (16), de T. RUMPF en 1893 (187), de J. HONL et J. BUKOWSKY en 1898 (101), enfin, ceux de R. EMMERICH et O. LOW en 1889 (40) qui utilisent pour la première fois en médecine un extrait antibactérien, la pyocyanase. Depuis cette période, de nombreux travaux ont paru et paraissent encore sur les métabolites de Pseudomonas aeruginosa.

A la même époque, en 1897, E. DUCHESNE (37 bis) traitait dans sa thèse de doctorat en médecine de "la concurrence vitale chez les microorganismes et l'antagonisme entre les moisissures et les microbes" et signalait la concurrence biologique entre Penicillium Glaucum et certains germes.

En 1896, se place l'isolement de la première substance antibiotique, extraite et cristallisée à partir d'un Penicillium par B. GOSIO (65), l'acide mycophénolique, dont l'étude a été reprise récemment par P. ABRAHAM.

En 1907, M. NICOLLE (148) signale l'existence de produits antibactériens sécrétés par des germes du groupe Subtilis, base des travaux récents effectués sur la Subtiline d'abord par E.F. JANSEN et D.J. HIRSCHMAN (106), puis par G. RAMON et ses collaborateurs (174), M. VALLEE (211), en France, A.J. SALLE et J.G. JANN aux Etats-Unis (188) et sur la Bacitracine particulièrement par J.A. JOHNSON, H. ANKAR et F.L. MELENEY (107).

Les travaux de A. VAUDREMER (212) sur les Aspergilli, à partir de 1912, n'eurent pas à cette époque, le retentissement qu'ils méritaient et ses essais de traitement de la tuberculose furent en partie méconnus.

Puis, les travaux se multiplièrent, sur l'action antibiotique des Actinomyces, des microbes et des champignons : R. LIESKE 1921 (133), A. GRATIA et S. DATH 1924-1932 (70-71-72-74-75); P. ZUKERMANN et I. MINKEWITSH 1925 (233), L. ROSENTHAL 1925 (186).

Au cours des années 1924 à 1928, J. SCHILLER (191) pu-

blie une série d'observations sur "l'antagonisme provoqué" qui ne semble pas avoir été exploité, sauf pour la sélection des germes du sol (S.A. WAKSMAN). En 1929 se place la première publication de A. FLEMING (45). A partir de 1939, d'innombrables travaux aboutissent à la préparation pratique de 3 antibiotiques : la Gramicidine de DUBOS, produite par B. BREVIS, mise au point et utilisée surtout en U.R.S.S. (Gramicidine S de A.S. KONIKOWA et collaborateurs (123) , la Pénicilline, produite par différentes souches de Penicillium notatum et chrysogenum, la Streptomycine de S.A. WAKSMAN et collaborateurs produite par Streptomyces griseus.

On voit donc, par ce très rapide rappel historique, que la recherche systématique des micro-organismes doués de propriétés antagonistes vis-à-vis d'autres germes a été poursuivie sur une grande échelle et suivant différentes techniques. Ces techniques peuvent être considérées comme les premiers essais de titrage, encore bien imprécis, des antibiotiques.

La première technique décrite fut sans doute celle de C. GARRE en 1887, ensemencement en stries parallèles ou radiées de Bacillus fluorescens et de Staphylococcus pyogenes. DOEHLE, dans sa thèse de 1889, décrit une méthode un peu différente : il ensemence de la gélatine fondue avec de la Bactéridie charbonneuse; verse le milieu en boite de Pétri et repique au centre, en carré, son "Micrococcus anthracotoxicus". La première de ces deux méthodes diffère peu de celle utilisée encore actuellement par S.A. WAKSMAN pour établir le "spectre bactériostatique" d'une substance donnée (223). La seconde constitue une anticipation de la méthode de HEATLEY.

III - TITRAGE D'UN ANTIBIOTIQUE

Toutes les techniques rappelées plus haut ne sont que très grossièrement quantitatives et ne peuvent guère servir qu'à mettre en évidence les propriétés antibiotiques soit d'un germe, soit de ses métabolites. C'est pourquoi, avant d'exposer les principales méthodes utilisées pour le titrage de la Pénicilline, nous voudrions discuter rapidement les conditions que doit remplir toute technique de titrage d'un antibiotique pour être valable et suffisamment précise.

Il est évident que, dans l'étude de chaque nouveau produit, se poseront aux chercheurs les mêmes problèmes; un des principaux sera celui de mettre au point une ou plusieurs méthodes de titrage, autant que possible rapides et d'une technique suffisamment simple. Or, en dehors des techniques proprement chimiques qui, jusqu'à présent, ne peuvent s'appliquer qu'à des produits suffisamment purs et concentrés, toutes les méthodes mises en oeuvre sont des méthodes biologiques. Le principe en est toujours le même, déterminer la plus petite quantité de produit qui, dans des conditions données, inhibe la croissance d'un germe convenablement choisi.

Toute mise au point d'une méthode de titrage suppose donc :

1°) LA DEFINITION D'UNE UNITE.-

Pour la Pénicilline, l'unité a été définie, avant l'adoption d'un étalon international, par H.W. FLOREY et A. JENNINGS (52), comme : la plus petite quantité de produit qui, diluée dans un volume de 50 cm3, inhibe la croissance de la souche témoin de Staphylococcus aureus, dans des conditions expérimentales déterminées.

On pouvait regretter que cette unité assez arbitraire fasse intervenir un volume de 50 cm3 qui a singulièrement compliqué les calculs quand on a mis au point des méthodes autres que la méthode des dilutions. Il eut été souhaitable d'adopter pour tous les antibiotiques 3 Unités :

a) une unité cm3 : la plus petite quantité inhibante contenue dans 1 cm3 du produit à titrer,

b) une unité litre : 1000 fois plus importante si la précédente était trop faible pour les travaux courants,

c) une unité gramme : à partir du moment où on sait préparer le produit purifié et cristallisé.

Actuellement, depuis que l'on obtient la Pénicilline à l'état cristallisé avec une pureté suffisante, l'unité de FLOREY a fait place à une unité définie par la réglementation américaine (Federal Register - Section 146-1) :

"Le terme unité (unit) s'applique à l'activité de la "Pénicilline contenue dans 0,6 microgramme du maître "étalon (master standard); le terme titre (potency) "s'applique au nombre de telles unités dans une quan-"tité donnée de substance".

L'unité ainsi définie est d'ailleurs très voisine de celle de FLOREY.

2°) LA FIXATION D'UN ETALON DE REFERENCE.-

En effet, dans tout titrage biologique, le nombre des paramètres difficilement contrôlables est tel que, quelles que soient les précautions prises pour se placer apparemment dans les mêmes conditions de titrage, les résultats varieront non seulement d'un Laboratoire à l'autre, mais dans un même Laboratoire, d'un jour à l'autre. Les principales causes de variation pourront être :

- variation dans la composition des milieux de culture utilisés,

- variation du germe test,

- différence des conditions d'incubation, etc...

D'où la nécessité absolue d'effectuer tous les titrages par rapport à un étalon considéré comme stable, qui permettra de calculer chaque jour un facteur de correction. P. HARTLEY, discutant en 1946 (82) de l'importance des Standards biologiques internationaux en Pharmacie, fait justement remarquer

que les premiers étalons utilisés pour le titrage de la Pénicilline étaient constitués de préparations impures et que le premier étalon utilisé en Grande-Bretagne, ne contenait guère qu'un dixième de Pénicilline. Il joua cependant son rôle jusqu'à la fixation de l'étalon actuel, défini comme suit par le Federal Register américain :

Le terme "maître étalon" (master standard) s'applique à un lot défini de Pénicilline G sodique cristallisée (Pénicilline sodique II), désigné par le Commissaire comme standard de comparaison pour déterminer l'activité des étalons de travail. Le terme "étalon de travail" (Working standard) s'applique à un lot donné d'une préparation homogène d'un ou plusieurs sels de Pénicilline, avec ou sans diluents, dont le titre a été déterminé par comparaison avec celui du maître-étalon.

Il est nécessaire, en France comme aux Etats-Unis, que les industriels préparant la Pénicilline, ainsi que les laboratoires chargés de son contrôle, utilisent des étalons de travail titrés par rapport à l'étalon international.

DEUXIÈME PARTIE

LES MÉTHODES DE TITRAGE DE LA PÉNICILLINE

En même temps que se poursuivaient les recherches sur la production de la Pénicilline, de nombreux expérimentateurs se penchaient sur le problème de son titrage qu'il était indispensable de résoudre rapidement, pour pouvoir suivre et comparer les différents essais de production et d'emploi clinique.

La démonstration de l'existence d'un antibiotique et son identification par le spectre bactériologique défini par S.A. WAKSMAN, peuvent déjà être considérées comme un titrage de dégrossissage et montrent l'activité sélective de l'antibiotique pour certains germes et la sensibilité relative de ceux-ci.

Mais il est indispensable d'avoir des méthodes de titrage précises et de les codifier pour rendre comparables les résultats de tous les expérimentateurs, et pour fixer des règles universelles d'application thérapeutique.

C'est dans ce but que s'est réuni à LONDRES du 16 au 18 Octobre 1944, un Comité sous les auspices du BUREAU d'HYGIENE de la Société des Nations.

La conclusion des travaux de ce comité fut la définition d'un étalon et d'une unité internationale de Pénicilline, qui allaient permettre à tous les chercheurs de se référer à la même base, donc de parler le même langage. Nous aurons l'occasion de revenir sur ces travaux.

Nombreuses sont les méthodes de titrage signalées dans la littérature scientifique anglo-saxonne, mais elles ont presque toutes une même base, à savoir l'inhibition partielle ou totale d'un germe, observée de différentes façons. Quelques-unes cependant s'appuient sur des principes différents, mais sont des méthodes peu employées.

Nous allons en faire rapidement l'exposé et la critique.

I - DIFFERENTES METHODES DE TITRAGE

A - METHODES BASEES SUR L'INHIBITION DE LA CULTURE D'UN GERME.-

Cette inhibition pourra être réalisée soit sur milieu solide en utilisant et mettant en évidence la diffusion du produit actif dans ce milieu, soit sur milieu liquide et la technique sera alors établie d'après les méthodes bactériologiques habituelles, en opérant par dilutions successives.

1°) Inhibition d'une culture in vitro - sur milieux ordinaires.

a) Milieux solides.-

Comme nous venons de le signaler les méthodes de titrage de la Pénicilline sur milieux solides sont basées sur la diffusion dans ce milieu du produit actif disposé par différents artifices à sa surface. Elles sont inspirées de la remarque initiale de FLEMING à l'origine de la découverte de la Pénicilline, la lyse du Staphylocoque autour d'une colonie de Penicillium, sur plaque d'agar, les germes éloignés de la moisissure se développant normalement. Cette observation primordiale montre que la substance active diffuse dans le milieu solide à partir du point où elle se trouve produite ou placée. L'aire de diffusion du produit est d'autant plus étendue que la concentration de celui-ci est plus forte.

Avec des modalités pratiques différentes, on disposera donc à la surface d'une plaque d'agar ensemencée d'un germe convenable, différentes dilutions de la liqueur à doser, et après incubation on mesurera les zones inhibées. Cette opération sera faite parallèlement avec une solution de pénicilline connue, ce qui permettra une interprétation quantitative des résultats. Les bases de ce procédé, appliqué aux solutions de Pénicilline, ont été jetées par E.P. ABRAHAM, E. CHAIN et leurs collaborateurs dans leurs premiers travaux sur la Pénicilline (2).

Diffusion à partir du champignon.-

La technique suivie est indiquée par A. FLEMING (45 bis) pour mesurer l'activité de la moisissure en croissance.

Elle consiste à cultiver le Penicillium sur une partie d'une plaque d'agar en boîte de Pétri, à laisser pousser le temps nécessaire à 24° et à ensemencer le ou les germes choisis en stries faisant des angles égaux avec la culture du champignon. Après incubation à 37° on mesure la partie où la culture microbienne ne s'est pas développée; si les germes ne poussent pas sur le milieu de culture du Penicillium, on peut après pousse suffisante du Champignon le recouvrir de gélose au sang où l'on ensemencera les bactéries. Le produit antimicrobien sécrété par le Penicillium diffuse vers la surface de la gélose et inhibe à dose suffisamment forte la croissance des espèces qui y sont sensibles.

Cette méthode sert pour des déterminations comparatives d'activité, lors de la recherche d'espèces actives. Elle ne peut donner lieu qu'à une évaluation quantitative grossière.

S.A. WAKSMAN et H.C. REILLY (224) indiquent également une technique proche de celle de A. FLEMING.

On fait pousser le champignon étudié à la surface d'un tube de gélose en culot. Après un temps donné de culture, on sort la gélose du tube et on en prélève de petits cylindres que l'on replace à la surface d'une gélose ensemencée en boîte de Pétri. Après incubation, on mesure et on compare les zones d'inhibition en fonction de la distance du champignon en croissance où a été prélevé le cylindre de gélose.

N.G. HEATLEY (85) appliquant une technique donnée par A. GRATIA (73) a mis au point un procédé permettant de mesurer le pouvoir antibactérien de microorganismes sur plusieurs ger-

mes simultanément : on place une feuille de cellophane sur une plaque d'agar et on cultive à sa surface la souche à essayer repiquée en stries parallèles. Après culture, on retire la cellophane et la culture qu'elle porte, et on ensemence sur l'agar en stries parallèles et perpendiculairement aux premières stries les germes à essayer. Après une deuxième incubation les germes ont poussé en stries interrompues sur un espace plus ou moins étendu au croisement des stries primaires et secondaires.

Cette technique n'est évidemment applicable qu'aux substances diffusibles à travers la cellophane, et ne donne aussi qu'une évaluation quantitative approximative.

Diffusion du liquide disposé dans une gouttière.-

C'est la première des techniques d'évaluation quantitative de Pénicilline en solution; elle fut indiquée par A. FLEMING en même temps que la méthode précédemment exposée concernant le Champignon en croissance.

Elle est utilisée surtout pour comparer l'action de la Pénicilline sur différents germes, mais peut donner lieu à une évaluation quantitative en opérant parallèlement avec une Pénicilline de référence; on découpe et on retire dans une plaque de gélose nutritive en boite de Pétri, une bande de 1 cm de large ou mieux encore selon L.M. VINCENT (219), on ménage une rainure dans la gélose à l'aide d'une baguette de verre préalablement disposée dans la boite de Pétri; on ensemence le reste de la gélose avec les différentes bactéries à essayer en bandes séparées perpendiculaires à la gouttière; on verse alors dans la gouttière un mélange à parties égales de Pénicilline à essayer et de gélose fondue. Après incubation à 37° on voit que selon leur sensibilité à la Pénicilline, les germes employés ont poussé plus ou moins loin de la gouttière. On peut, pour chacun d'eux, mesurer la distance inhibée, qui sera à peu près proportionnelle à la quantité de Pénicilline versée dans la gouttière.

Diffusion du liquide disposé dans un cylindre.-

"OXFORD CUP" de HEATLEY.-

Cette méthode généralement connue sous le nom de "méthode de HEATLEY" qui l'a particulièrement étudiée, est une des méthodes de titrage de la Pénicilline les plus employées. Elle est d'ailleurs applicable à tous les agents antimicrobiens et a été spécialement étudiée par G.J. HARPER et W.C. CAWSTON (81) pour les sulfamides et par F.W. TANNER et F.L. WILSON (206) pour les alcools aliphatiques.

Elle a été primitivement indiquée par E.P. ABRAHAM et l'équipe d'OXFORD en 1941 (2). Elle consiste à disposer la solution à doser diluée ou non dans de petits cylindres placés à la surface d'une plaque de gélose préalablement ensemencée avec le germe d'essai (Staphylocoque le plus souvent).

Après 18 heures environ d'étuve à 37°, il s'est formé autour de chaque cylindre une zône d'inhibition circulaire dont le diamètre dépend de la concentration en pénicilline. On mesure le diamètre de la zone inhibée, et pour en déduire la concentration en Pénicilline, on fait la même opération avec des con-

centrations connues d'une Pénicilline de référence.

Mais pour donner des résultats réguliers, la technique utilisée doit être très rigoureuse.

Les cylindres varient légèrement par leur taille ou leur matière suivant les auteurs.

Le milieu nutritif donne également lieu à des variantes qu'ont étudiées P.BROCH, Y. KERHARO et J. NETICK (18).

Quant à l'organisme d'essai c'est généralement un Staphylococcus aureus qui est utilisé, bien que considéré comme instable par W. JACKSON, J.W. FOSTER, et H.G. WOODRUFF (104), et par M.B. SHERWOOD, E.A. FALCO et E.J. de BEER (200) qui ont employé des spores de Bacillus subtilis.

Pourtant H.R. CURRAN et F.R. EVANS (32) ont attiré l'attention sur le fait que la Pénicilline est fortement sporicide et sur les conséquences que cela présente dans les titrages.

Néanmoins, N.G. HEATLEY (84) d'une part, J.W. FOSTER et H.B. WOODRUFF (57) d'autre part, ont mis au point une technique utilisant l'un ou l'autre germe.

A.D. GARDNER (60) a également essayé les spores de Bacillus anthracis.

La pose des cylindres à la surface de la gélose constitue un temps délicat du titrage et peut être facilitée par divers artifices, tel que le gabarit percé de trous adapté aux boîtes de Pétri donné par E.J. OSWALD et W.A. RANDALL (152), ou celui de G.W. BEADLE, H.K. METCHELL et D. BONNER (9), adapté à de grandes boites rectangulaires pouvant contenir 40 cylindres alors qu'on n'en met que 4 à 6 par boîte de Pétri.

Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure du diamètre des zônes que l'on reporte sur une courbe établie avec une Pénicilline standard. Le diamètre n'est pas exactement proportionnel à la concentration et les meilleurs résultats sont ceux correspondant à un cercle d'inhibition de 20 à 25 mm de diamètre.

Une interprétation graphique des résultats reprise par le Federal Register américain a été mise au point d'une part par F.M. GOYAN et J. DUFRENOY (68), et d'autre part par L.F. KNUDSEN (124).

R. PRATT et J. DUFRENOY seuls (162) puis en collaboration avec F.M. GOYAN et L.A. STRAIT (69) ont essayé de réduire, le temps d'incubation en faisant une préincubation de 3 heures, puis une incubation de 3 heures également, après avoir mis les solutions à titrer dans les cylindres, et en faisant apparaître enfin les zônes par un artifice de coloration (réactif de SCHIFF ferricyanure de potassium et sulfate ferrique, nitrate d'argent....).

Ce procédé est basé sur l'exaltation de l'activité microbienne par les petites doses de Pénicilline, notamment de l'activité diastasique avec intensification des réactions cytochimiques qui se traduit par une coloration plus intense de la marge d'inhibition.

Mais R. KNOX (119) note que l'allure et le diamètre des zones d'inhibition dépend du moment de l'addition de la Pénicilline.

Les conditions expérimentales de la méthode de HEATLEY ont été étudiées par W. HAYES (83) et par E. GALLARDO (58) qui en ont fait la critique, alors que d'autre part W.H. SCHMIDT et A.G. MOYER (192) en établissaient la précision.

Diffusion du liquide fixé sur des disques de papier filtre.-

C'est une technique qui fut inventée par J.C. VINCENT et H.W. VINCENT (220).

Les tubes sont ici remplacés par de petits disques de papier filtre découpés à l'emporte-pièce et stérilisés que l'on imbibe des dilutions de Pénicilline à doser, et que l'on place sur la gélose d'une boite de Pétri préparée comme précédemment. Il faut prendre soin de bien imprégner les disques de papier, mais aussi de les égoutter soigneusement pour éviter un excès de liquide qui se répandrait sur la gélose et viendrait troubler les résultats.

J.M. MAC GUIRE (135) conseille même de réaliser l'inhibition à la pipette dans un temps donné et M.B. SHERWOOD, E.A. FALCO et J.J. de BEER (199) utilisent une anse de nichrome jaugée; il faut aussi veiller à l'adhérence uniforme des rondelles sur la gélose.

La lecture et l'interprétation des résultats se font comme dans le cas des cylindres de HEATLEY.

Ce système est une simplification intéressante de la méthode de HEATLEY, l'emploi des disques de papier étant plus pratique et plus rapide que celui des tubes.

J.A. EPSTEIN et ses collaborateurs (42) utilisent cette technique, mais réalisée sur de grandes boîtes de Pétri avec des disques de papier de 1 cm de diamètre.

D.C. MORLEY l'emploie également, mais il sèche les disques de papier filtre suivant un procédé spécial et fait le dosage sur un bacille aérobie (144).

Il est intéressant de noter que celui-ci conserve également des disques imprégnés d'une solution de Pénicilline connue, pour rechercher la sensibilité à la Pénicilline d'un germe pathogène avant d'entreprendre un traitement. A.R. THOMAS et ses collaborateurs (207) avaient déjà signalé l'intérêt de cette méthode pour l'appréciation de la sensibilité d'un germe à la Pénicilline.

R.E. HOYT et M.G. GJELHAUG LEVINE (102) emploient dans ce but une technique très proche : les disques de papier sont remplacés par des comprimés (phosphate bicalcique, amidon, gomme acacia), de poids et de diamètre déterminés auxquels est incorporé l'antibiotique à essayer. Posés sur une plaque de gélose ensemencée du germe test, ils déterminent des zones d'inhibition que l'on mesure.

Diffusion du liquide placé dans une cupule creusée dans la gélose (Agar Cup).

Inventée par A. FLEMING (45 bis) cette méthode ne nécessite plus ni cylindres, ni disques de papier.

On prépare et on ensemence, comme dans les techniques précédentes, une plaque d'agar en boîte de Pétri, et on y découpe à l'emporte-pièces des disques de 9 mm de diamètre qu'on enlève. Dans chaque trou ainsi obtenu on verse 2 gouttes de gélose fondue simplement pour en garnir le fond. On place alors 2 ou 3 gouttes de la solution de Pénicilline à essayer dans la cupule. On fait incuber.

Comme autour des cylindres de HEATLEY et autour des disques de papier, il se produit autour du trou une zone d'inhibition de la culture microbienne.

J.S. WOOLEY et H. SCHMIDT (229) utilisent ce procédé avec des cupules de 10 mm de diamètre et des solutions de Pénicilline dont la concentration ne dépasse pas 0,1 unité par cm3.

W.H. WILKINS et G. HARRIS (226) inoculent la totalité de la gélose fondue avec le germe choisi, la coulent en boite et après refroidissement y découpent des cupules de 11mm de diamètre où est versé le liquide à essayer. L'évaluation de l'activité est faite en comparant les zones d'inhibition obtenues avec la solution à doser et avec une solution de chlorure mercurique à 0,50 pour 100.

C'est le seul dosage où l'étalon de comparaison n'est pas constitué par une Pénicilline connue mais par une substance chimique définie.

Au lieu de découper les cupules à l'emporte-pièce stérile, L.S. CHOLDEN (28) dispose dans les boites de Pétri avant d'y couler la gélose, de petits cylindres en caoutchouc stériles, qu'il retire après refroidissement de l'agar et qui laissent à leur place un trou prêt à recevoir la solution à doser.

Méthode des gouttelettes sur plaque.-

La méthode des gouttelettes sur plaques de P.B. WHITE (225) n'est plus basée sur la diffusion de la Pénicilline dans l'agar. On fait agir différentes dilutions de Pénicilline directement sur le Staphylocoque et on ensemence ensuite pour voir quelle dilution a inhibé le germe.

Nous citons ici l'auteur de la méthode:"il s'agit de préparer les concentrations croissantes de Pénicilline en solution tampon, puis après les avoir ensemencées uniformément avec du Staphylocoque, de déposer des gouttelettes identiques des différents mélanges. Les séries utilisant l'étalon et la substance inconnue étant juxtaposées sur la surface horizontale d'une plaque d'agar nutritif de composition et d'épaisseur uniforme : puis, une fois les gouttelettes absorbées, de placer à l'étuve les milieux ensemencés et de comparer en temps voulu l'inhibition de la croissance dans les séries de contrôle et inconnues telle qu'elle se révèle aux points d'ensemencement, et cela en vue d'arriver à évaluer, par rapport à celle de l'étalon, l'activité des échantillons de Pénicilline sur

lesquels porte le titrage".

P.B. WHITE donne ensuite un exposé très détaillé des conditions expérimentales rigoureuses que l'on doit observer pour que la concentration en Pénicilline soit la seule variable du système.

Il admet que jusqu'à 2 heures de contact à la température du laboratoire entre la Pénicilline et le Staphylocoque avant l'ensemencement du mélange, les conditions restent inchangées. L'ensemencement se fait à l'aide d'une pipette spéciale permettant de déposer des gouttelettes bien régulières à la surface de la gélose.

Après incubation, les gouttelettes où la concentration en Pénicilline était insuffisante pour inhiber le Staphylocoque, ont cultivé. Plus la concentration en Pénicilline augmente, moins cette culture est importante; elle est centripète, et à la limite se marque juste par une très légère ligne de culture à la périphérie de la goutte initiale.

On compare les cultures limites de l'étalon et des différentes dilutions de la Pénicilline à titrer.

Il est évident que cette méthode ne peut être utilisée que pour des Pénicillines dont on connaît déjà le titre approximativement car les comparaisons et la recherche de la culture limite doivent porter sur des concentrations très voisines pour le standard et le produit inconnu.

Ce procédé se prête à un enregistrement photographique direct sur papier en négatif qui présente l'avantage de rendre la lecture du résultat plus facile.

Méthode officielle américaine (F.D.A.).-

La méthode officielle américaine, exposée dans le FEDERAL REGISTER, Section 141-1, est une modification de la méthode de HEATLEY, dans laquelle tous les temps de l'opération sont soigneusement codifiés :

a) dimension des cylindres,

b) milieux de culture à utiliser, qualité des produits entrant dans la composition de ces milieux et technique pour les apprécier,

c) entretien et conservation du germe test : Staphylococcus aureus FDA 209 P.

Elle utilise 4 boîtes par titrage, deux cylindres de la boîte étant emplis d'une dilution du standard, les deux autres du jus à titrer.

L'originalité principale de la méthode consiste en une interprétation graphique, permettant, par des calculs simples, d'obtenir pour chaque titrage, le titre moyen et l'erreur du titrage.

Méthode de Brodie.

Basée également sur les phénomènes de diffusion, la

méthode de J. BRODIE (19) suit une technique toute différente. Il s'agit d'ensemencer dans la masse un milieu gélosé à base de peptone et fortement tamponné, réparti à raison de 1,5 cm3 dans de petits tubes de 8 mm de diamètre intérieur. Après solidification du milieu, on verse à la pipette 0,25 cm3 de dilution convenable de la liqueur à titrer (dilution dont le titre doit être compris entre 0,5 et 2 unités par cm3). On fait incuber à 37° pendant 16 à 24 heures et on mesure en mm la distance entre le ménisque de gélose et la colonie la plus élevée dans le tube visible à l'oeil nu. On compare naturellement avec les résultats fournis par une Pénicilline Standard.

Cette technique simple employée également par I.N. ASHESHOW et F. STRELITZ (5) est applicable aussi bien aux jus de culture, au contrôle d'une Pénicilline utilisée en clinique et au titrage de la Pénicilline dans l'urine. Les résultats sont suffisamment précis pour le travail courant.

Nous en avons terminé avec les méthodes de titrage de la Pénicilline réalisées sur milieu solide. Nous allons continuer en étudiant les procédés utilisant des milieux liquides.

b) Milieux liquides.-

Les techniques qui utilisent des milieux de culture liquides sont inspirées des méthodes bactériologiques classiques. Elles opèrent par dilutions successives et recherchent la plus faible concentration active du produit à essayer. Elles diffèrent entre elles par la façon de réaliser l'inhibition d'une part, et d'autre part par celle de l'observer. Les facteurs variables de la réaction sont d'abord le milieu de culture, puis le germe employé et la dose d'ensemencement, enfin la mise en évidence de l'inhibition.

On peut classer ces méthodes en 2 groupes d'après le mode d'observation de l'inhibition; les techniques dans lesquelles l'inhibition est appréciée à l'oeil nu, et celles qui utilisent le photomètre.

1°) Inhibition appréciée à l'oeil nu.-

Après une incubation prolongée des tubes de la réaction contenant les diverses dilutions du produit à essayer, ensemencées de Staphylocoques, on observe la présence ou l'absence de culture selon les tubes. La plus faible concentration qui ne présente pas de culture visible est choisie comme limite d'activité. On observe donc ici non pas une inhibition totale, mais seulement l'inhibition apparente à l'oeil nu.

C'est le principe de la méthode d'Oxford, que nous exposerons en détail ultérieurement.

Méthode au Lactobacillus bulgaricus.-

Assez récemment G. SANCHEZ et A. LAMENSANS (189) ont proposé une technique opérant également par dilutions successives, mais utilisant le Lactobacillus bulgaricus comme germe test, basée sur les variations du pH du milieu (lait écrémé dilué) dûes à la formation d'acide lactique quand le microbe se développe.

L'acidification est rendue apparente par le virage d'un indicateur (rouge de méthyle et bleu de méthylène) vert quand le germe ne s'est pas développé passant au rouge par la pousse microbienne. L'indicateur est ajouté simplement au moment de la lecture des titrages, c'est-à-dire après 2 heures 30 d'incubation à 45°.

Cette technique est applicable aussi bien à la Streptomycine qu'à la Pénicilline.

2°) Inhibition appréciée au photomètre.-

C'est J.W. FOSTER (54) qui a jeté les bases des méthodes de titrages par turbidimétrie.

On ne recherche plus ici un seuil de turbidité, mais se basant sur le fait que l'inhibition de la pousse du Staphylocoque est proportionnelle à la concentration en Pénicilline, on mesure au photomètre les densités optiques progressives de chacun des tubes de la réaction. Une courbe traduisant le rapport entre la concentration en unités de Pénicilline et la densité optique correspondante est construite pour chaque série d'expériences avec un Standard.

Pour évaluer l'activité d'un échantillon inconnu, on porte sur la courbe la densité optique mesurée de chaque tube, d'un titrage et on en déduit la concentration. Comme on en connait la dilution, on calcule l'activité du produit initial. On obtient ainsi une valeur pour chaque tube, la moyenne des chiffres obtenus est choisie comme valeur de l'activité de l'échantillon inconnu.

Sur ce principe, plusieurs techniques ont été réalisées : la méthode de S.M. MANN (139) réalise l'incubation des tubes ensemencés de Staphylocoques pendant 16 heures à 37°.

Les autres méthodes au contraire ont cherché à diminuer ce temps d'incubation. S'il est nécessaire dans la méthode d'Oxford de poursuivre pendant une durée assez longue l'incubation, la dose d'ensemencement étant suffisamment faible pour ne pas influer sur la densité optique appréciable à l'oeil nu et permettant l'appréciation d'un seuil, lorsque l'appréciation est faite au photomètre (plus sensible que l'oeil), on utilise une dose d'ensemencement initiale beaucoup plus forte, et de ce fait la durée peut être réduite : on n'évalue plus un seuil, mais des opacités croissantes.

J.W. FOSTER et B.L. WILKER (55), ont fait l'étude néphélémétrique d'inhibition d'un germe par la Pénicilline dans des bouillons à différents pH.

D.A. JOSLYN (108) et J.R. MAC MAHAN (138) ont décrit une méthode ne demandant que 3 à 4 heures d'incubation en utilisant le Staphylocoque comme germe d'essai.

Ce temps de 3 à 4 heures est même susceptible d'être réduit à 1 heure 1/2 d'après S.W. LEE et ses collaborateurs (126) à condition d'employer, non plus le Staphylocoque, mais un Streptocoque du groupe B. LANCEFIELD à pousse rapide.

Récemment H. VELU et J. MAINIL (214) et (215) ont mis au point une technique inspirée de R. MAC MAHAN et de C.A. GREEN (76) en appliquant à la bactériologie les techniques rigoureuses des mesures physiques (emploi de pipettes à 1/100cm3, fioles jaugées) qui donne des résultats exacts à ± 5 pour 100 pour un dosage comprenant 7 tubes de réaction par échantillon inconnu, en 3 heures 30, en employant un milieu riche en facteurs de croissance (extrait de coeur, autolysat de levure).

Enfin, D.A. JOSLYN et M. GALBRAITH (109) ont généralisé ces techniques pour les appliquer à des antibiotiques inconnus, pour lesquels on ne possède donc pas de standard, en choisissant comme limite d'activité la dose d'antibiotique qui inhibe la culture du germe test à 50 pour 100.

De plus, E.E. OSGOOD (151) en a donné une interprétation mathématique et étudié la précision.

2°) Inhibition d'une culture in vitro - sur milieu de culture de tissus.-

Il s'agit là d'une méthode très rarement employée, et qui a été mise au point par D.H. HEILMANN (37). Elle consiste à rechercher la dose de pénicilline qui empêche la croissance d'une souche de Diplococcus Pneumoniae sur milieu semi-solide pour culture de tissu.

C'est uneadaptation de la méthode décrite par J.T. KING, A.F. HENSCHEL et B.S. GREEN pour les sulfamides (114), (115), D.H. HEILMANN s'est trouvée conduite à utiliser cette méthode dans ses recherches de standardisation des dosages de Pénicilline, ayant remarqué que les baisses de titres que l'on peut avoir avec une Pénicilline sont différentes selon les méthodes de titrage employées et que celles-ci nécessitent de plus la comparaison avec un Standard de la stabilité duquel on doit être sûr. Elle l'utilise d'ailleurs dans ses comparaisons entre Pénicilline et Gramicidine (D.H. HEILMAN et W.E. HERREL (88), (89) et (90).

La technique suivie est celle de J.T. KING (113).

La souche bactérienne utilisée est un Diplococcus Pneumoniae entretenu sur milieu de HARTLEY additionné de 10 pour 100 de sérum. Il est sensible à la Pénicilline et pousse bien sur le milieu de culture de tissus.

Le milieu de culture de tissus est à base de sang de lapin, de sérum additionné d'héparine, et d'extrait d'embryon de poulet que l'on doit préparer quotidiennement.

On dilue la culture de Pneumocoque dans le milieu à l'extrait d'embryon, on y ajoute la Pénicilline à diverses concentrations dans l'eau physiologique, et l'on porte 3 gouttes de ce mélange sur 1 goutte de plasma étalée sur une lame. On recouvre d'une lame évidée, on scelle à la paraffine, puis on porte à 37° dans un incubateur spécial. Après 36 heures, on effectue la numération des colonies au microscope.

Le point limite est celui où aucune colonie ne pousse.

Le dosage d'un standard a été fait ainsi, et on a trouvé que la dose inhibitrice était de 0,084 unité Oxford

par cm3.

Le titre d'une préparation inconnue est donc obtenu en divisant par 84 le nombre de microgrammes nécessaires pour obtenir l'inhibition totale.

Cette méthode est assez compliquée, et ne peut être utilisée pour la pratique courante du laboratoire car elle nécessite non seulement des milieux de culture très particuliers, mais aussi des pipettes standardisées et des tubes mélangeurs spéciaux. Elle est, de plus, plus longue que toutes les autres méthodes existantes, et sa précision n'est pas telle qu'elle puisse malgré tout cela s'imposer (10 à 20 pour 100 en moyenne).

3°) Inhibition d'une culture in vivo - sur oeuf embryonné.-

Il s'agit ici d'une technique donnée par J.A. EPSTEIN, E.J. FALCO et S.W. LEE (41), qui ont étudié la protection apportée par la Pénicilline contre l'infection expérimentale de l'oeuf embryonné. Ces auteurs ont conclu de leurs expériences que 0,1 unité de Pénicilline par cm3 d'oeuf embryonné suffit à arrêter l'infection provoquée par le Staphylocoque, le Streptocoque ou le Pneumocoque. Ces résultats peuvent d'après eux être appliqués à des dosages de Pénicilline : il suffit de chercher la plus petite quantité de Pénicilline inconnue qui empêche l'infection provoquée de l'oeuf, et cette quantité correspondra donc à une concentration de 0,1 unité par cm3 d'oeuf.

On calcule le volume de l'oeuf pour en déduire la concentration du liquide essayé en Pénicilline. J.A. EPSTEIN, et ses collaborateurs, admettent qu'il est inutile d'opérer parallèlement avec un étalon et que cette concentration active de 0,1 unité par cm3 d'oeuf peut être considérée comme constante. Il ne semble pas que l'on puisse se ranger à cette opinion : tout dosage biologique est susceptible de variations inattendues et imprévisibles, aussi est-il toujours indispensable de se référer à une base connue. Cela semble d'autant plus important ici où l'on a affaire non pas à un seul, mais à deux êtres vivants : le germe microbien et l'oeuf embryonné.

Nous n'insisterons pas sur cette méthodequi ne présente aucun intérêt pratique, mais seulement celui de l'originalité.

B - METHODES BASEES SUR L'INHIBITION DE L'ACTIVITE PHYSIOLOGIQUE D'UN GERME.

Comme les méthodes basées sur l'inhibition de la culture d'un germe déterminé opérant en milieu liquide, ces méthodes de titrage procèdent également par dilution. Mais on n'observe plus ici la présence ou l'absence du germe lui-même pour savoir si la Pénicilline a agi ou non, mais celle d'une manifestation physiologique de sa vie, variable selon le germe choisi.

Exception faite des méthodes opacimétriques, toutes les méthodes de dosages étudiées nécessitent un minimum de 18 heures d'incubation comme nous l'avons déjà vu.

Quand il s'agit du dosage d'une liqueur en cours de culture, ce temps d'attente peut être préjudiciable en empêchant d'arrêter la culture à sa concentration maxima en Pénicilline, celle-ci augmentant dans son milieu de production, passant par un maximum d'une durée pouvant être assez courte selon le milieu de culture utilisé, puis diminuant brutalement.

L'intérêt primordial des techniques opacimétriques est incontestablement leur rapidité. D'autres auteurs ont cherché également, en utilisant les propriétés physiologiques diverses de certains germes, à réaliser des dosages rapides.

1°) Inhibition du pouvoir hémolytique.-

U. WILSON (227) imagina et mit au point une méthode de dosage prenant l'hémolyse comme test de réaction. Le principe en est le suivant : si l'on met en présence un Streptocoque hémolytique, des globules de mouton et diverses dilutions de Pénicilline, et que l'on porte à l'étuve à 37°, la pousse du Streptocoque sera inhibée par la Pénicilline, jusqu'à une certaine dilution et il n'y aura pas d'hémolyse. Au contraire, là où la Pénicilline n'aura plus agi, le Streptocoque aura poussé et aura hémolysé les globules, et le liquide sera coloré en rouge.

En opérant parallèlement avec une Pénicilline de référence on en déduira l'activité de la Pénicilline essayée.

L'hémolyse est nette après 3 heures à 3 heures 1/2 d'étuve à 37°. De plus, en raison de sa rapidité même, cette méthode n'exige pas la stérilité des solutions que l'on titre.

U. WILSON emploie un Streptocoque du groupe A hémolytique entretenu sur gélose nutritive. On en fait au moment de l'emploi une suspension par lavage de la gélose avec du bouillon nutritif, suspension que l'on amène à 500 à 700 x 10^6 germes par cm3.

La réaction est faite dans des tubes contenant 1 cm3 de bouillon nutritif quelconque stérile dans lequel on ajoute 0,2 de suspension de germes et 0,3 cm3 de globules rouges de mouton lavés et dilués à 1/5 en volume, puis des quantités allant de 0,1 à 0,5 de dilution à 1/7 d'une solution de Pénicilline à doser titrant environ 1 unité Oxford par cm3. On porte 3 heures à 3 heures 1/2 à 37°. On centrifuge et on apprécie l'hémolyse.

Chaque série de tests comporte un témoin fait avec une Pénicilline standard.

Il nous semble utile à la suite de remarques personnelles d'ajouter à ce protocole tel que le donne U. WILSON et qui convient à la souche et aux milieux qu'elle emploie, qu'il est nécessaire quand on entreprend une série de titrages avec cette méthode, de vérifier :

1°) que la suspension de Streptocoques ne contient pas d'hémolysines préformées. Pour cela on prépare une suspension de Streptocoques assez concentrée par lavage de la gélose. On filtre sur bougie et on vérifie que le filtrat n'est pas hémolytique en

le mettant en contact en quantités croissantes avec une quantité constante de globules lavés dilués à 1/5. On place 3 heures à 37°. Il ne doit pas y avoir d'hémolyse au bout de ce temps.

2°) Quel est le pouvoir hémolytique du Streptocoque dont on dispose ? Pour cela on en prépare une suspension à la densité que l'on veut utiliser dans les titrages, et on en met des quantités croissantes en contact avec des quantités constantes de globules (dose de globules à utiliser dans les titrages), dans le milieu nutritif que l'on emploiera pour les dosages ultérieurs. On recherche ainsi la quantité minima de Streptocoques à utiliser pour avoir l'hémolyse totale d'une dose donnée de globules rouges, en 3 heures à 37°.

On pourra, dans les titrages, employer une dose de Streptocoques double de la dose minima donnant l'hémolyse totale, ce qui convient parfaitement.

Ces titrages préliminaires devront être faits pour chaque souche de Streptocoque ou chaque milieu de culture nouveau; les doses de suspension de Streptocoques à utiliser peuvent en effet être variables selon que l'on emploie un bouillon peptoné, ou un bouillon de viande, additionné ou non de glucose, de sérum ....

Cette méthode présente un grand intérêt par sa rapidité à donner un résultat et peut être d'une grande aide lorsqu'il s'agit de suivre l'évolution d'une culture, mais elle comporte malgré tout certains inconvénients qui ne sont pas négligeables.

Tout d'abord elle nécessite une préparation préliminaire assez longue, lavage des globules frais, et surtout numération de la suspension de Streptocoques qui doit être amenée à 500 à 700 millions de germes par cm3 pour l'emploi. On ne peut se dispenser de cette numération, la densité de la suspension obtenue par lavage au bouillon d'une culture sur gélose pouvant être assez variable. Les hémolysines préformées y existant ne permettent pas d'utiliser une culture sur bouillon qui, prise dans des conditions constantes (culture de 24 heures par exemple), donne une quantité de germes régulière et éviterait ainsi la numération toujours longue et fastidieuse.

Enfin, le point le plus délicat est l'entretien d'une souche fortement hémolytique. U. WILSON propose l'entretien sur gélose nutritive, sans aucune autre précision, qui éviterait les hémolysines préformées, mais elle ne parle pas du pouvoir hémolytique.

Il nous semblerait meilleur d'entretenir la souche de Streptocoque sur gélose au sang avec passages périodiques sur souris, méthodes qui conservent au mieux le pouvoir hémolytique. La gélose ordinaire en provoquerait inévitablement l'affaiblissement et peut être même la disparition.

En vue de raccourcir encore le temps nécessaire aux dosages, G. RAKE et H. JONES (166) ont modifié légèrement la méthode originale de U. WILSON. Ils utilisent une culture de

Streptocoques de 2 heures en bouillon sérum dans laquelle l'organisme se multiplie rapidement mais, d'après ces auteurs, avec un taux d'hémolysine préformée insuffisant pour modifier l'expérience. Ils emploient les globules rouges de lapin, et le bouillon au coeur de boeuf comme milieu d'épreuve. L'utilisation d'un Streptocoque en pleine multiplication permet de réduire le temps de séjour à l'étuve à 1 heure ou 1 heure 1/2. L'emploi direct du bouillon supprime la numération des germes.

Les auteurs emploient cette méthode principalement pour le dosage de la Pénicilline dans les cultures en cours, sa grande rapidité permettant de suivre la sécrétion de Pénicilline de très près et d'arrêter les cultures à son maximum.

La méthode hémolytique peut également être utilisée au dosage de la Pénicilline dans les liquides organiques, comme l'indique CH. RAMMELKAMP (169) et serait même, dans ces cas-là, le meilleur procédé selon H.A. RANDALL, C.W. PRICE et H. WELCH (176). Son auteur précise qu'il est possible de cette façon de déterminer 0,0038 unité de Pénicilline dans 0,2 cm^3 de liquide.

2°) Inhibition de la respiration.-

J. HIRSCH (95) étudiant le mécanisme d'action de la Pénicilline in vitro suivit les modifications apportées par la Pénicilline dans une culture de Staphylocoque en mesurant les variations de la respiration de cette culture par rapport à un témoin sans Pénicilline. C'est ainsi qu'il observe qu'une culture de Staphylocoques au repos respire normalement en présence de Pénicilline, alors qu'une culture dans sa phase de multiplication est tuée peu à peu. Il essaya de déduire une méthode de titrage de ses observations.

D'après J. HIRSCH (96) le titrage d'une solution de Pénicilline peut être fait par la mesure du ralentissement (en pourcentage) de la consommation d'oxygène de cultures de Staphylocoques additionnées de quantités progressives de Pénicilline par rapport à la consommation de la culture témoin. L'expérience est conduite en même temps avec la liqueur à doser et avec une solution de Pénicilline étalon.

Le milieu de culture employé par J. HIRSCH est un milieu dépourvu de glucose, qui élimine l'erreur pouvant être éventuellement amenée par la Notatine qui n'agit qu'en présence de glucose. La source d'énergie utilisée est le lactate de sodium.

La mesure de l'oxygène consommé est faite au WARBURG toutes les 1/2 heures et après quelques heures on peut construire la courbe du pourcentage d'oxygène consommé en fonction de la concentration en Pénicilline. Ceci pour la solution étalon. Reportant sur cette courbe les quantités d'oxygène consommé dans le cas de la solution à doser, on en déduit la concentration de cette solution en Pénicilline.

Cette méthode de dosage peut donner un résultat en quelques heures, mais les mesures et les calculs qu'elle nécessite sont longs et elle n'est utilisable que si l'on a peu de dosages à faire.

L'auteur ne donne pas d'indication sur la précision de

sa méthode par rapport aux autres méthodes de titrages existantes.

La méthode de réductasimétrie que nous verrons plus loin est basée également sur les modifications des échanges respiratoires d'une culture en présence de Pénicilline.

3°) Inhibition du pouvoir réducteur du Staphylocoque.-

Le Staphylococque qui est un germe aérobie consomme l'oxygène du milieu où il pousse et en réduit les constituants, en particulier les nitrates et les transforme en nitrites. Lorsque la concentration en Pénicilline, dans le milieu, est suffisante pour inhiber le Staphylocoque, il n'y a plus formation de nitrites. Le titrage consiste à doser les nitrites dans les tubes de la réaction après incubation au bain marie à 37°. A. GOTH et M.T. BUSH (66) d'une part et W.A. RANDALL et C.W. PRICE (175) d'autre part ont mis au point cette méthode et emploient un Staphylococque à pousse rapide qui permet une incubation de 1 heure à 1 heure 1/2. A. GOTH et M. BUSH dosent les nitrites, en additionnant le milieu de titrage d'acide para amino benzoïque qui donne, avec les nitrites un dérivé azoïque rouge en présence d'acide trichloracétique et de dichlorhydrate de N 1 naphtyl éthylène diamine.

L'évaluation de la coloration obtenue se fait au colorimètre photoélectrique, la dose de nitrites est connue en se reportant à une courbe préalablement établie avec des doses connues d'acide para amino benzoïque et de nitrites.

Ce dosage peut également être fait selon la technique de B.F. RIDER et M.G. MELLON (183) qui mesurent au spectrophotomètre la coloration rouge obtenue par combinaison de l'amino naphtalène avec l'acide 4 aminobenzène sulfonique en présence des nitrites.

Le titrage d'un standard de Pénicilline est naturellement fait en même temps que chaque série d'expériences.

La précision de cette technique est environ 8 pour 100, mais ses auteurs font remarquer qu'elle ne peut être réalisée que par des expérimentateurs exercés, car le dosage des nitrites est délicat et réclame des conditions très rigoureuses de pH et de température, et ne concerne que des produits chimiquement purs.

4°) Inhibition du pouvoir réducteur de germes anaérobies.-

A. PREVOT de l'Institut Pasteur de PARIS (163) a donné une méthode de principe comparable à la précédente, qui utilise un germe anaérobie, le Welchia perfringens et le vert Janus comme indicateur de pH.

A. PREVOT signale d'ailleurs également une autre méthode plus ancienne, celle de HELLER, employant aussi le Welchia perfringens, et prenant comme test la production d'acroléine à partir de glycérine qu'on ajoute au milieu de culture. L'acroléine est dosée après incubation, mais cette technique est longue et compliquée. Dans la technique de A. PREVOT, on observe directement la décoloration du vert Janus contenu dans le milieu de titrage.

Le bouillon au vert Janus est, après stérilisation, rose violacé. Lorsque le W. perfringens s'y développe, c'est-à-dire dans un titrage lorsque la concentration de la Pénicilline ajoutée est insuffisante pour l'inhiber, le vert Janus est décoloré et le bouillon devient jaune.

Cette méthode est intéressante par la rapidité : le virage du vert Janus est net après là 2 heures d'incubation au bain-marie à 37°, mais elle est un peu délicate et nécessite une technique rigoureuse.

Nous allons donner quelques précisions sommaires et faire part de quelques remarques que nous avons eu l'occasion de faire sur cette méthode(1).

Bouillon utilisé.-

C'est le bouillon Viande Foie de A. PREVOT pour culture d'anaérobies, glucosé à 2 pour 100. La souche de W. perfringens est conservée sur ce milieu. On l'utilise également pour les dosages additionné de vert Janus, A. PREVOT indique 2,5 cm3 de solution de vert Janus à 1 pour 100 par litre de bouillon. Mais il ne faut pas oublier que les différents échantillons de Vert Janus peuvent varier suivant leur origine. Il est donc indispensable pour chaque nouvel échantillon de colorant de rechercher la dose à employer (on pourra par exemple par litre de bouillon V.F. essayer 2,5 cm3 de solution à 0,25-0,50-0,60-0,70-0,80-0,90-1-1,25-1,50 pour 100). La dose de Vert Janus à choisir sera celle qui sera décolorée complètement en 1/2 à 1 heure d'incubation au bain-marie à 37° par 0,1 cm3 de culture de W. perfringens d'un âge choisi.

Le bouillon est réparti en tubes de Hall sans billes, les tubes étant remplis jusqu'à l'étranglement, ce qui correspond à un volume de 7 cm3 environ. Il est nécessaire de régénérer le bouillon en plaçant les tubes au bain-marie bouillant pendant 1/2 heure pour en chasser l'air, avant l'emploi.

Souche microbienne.-

A. PREVOT utilise le Welchia perfringens H.A. de sa collection. On le conserve en bouillon viande foie, en tube scellé sous vide à la température du Laboratoire.

On peut d'après l'auteur de la méthode employer pour les dosages une culture de 2 à 16 heures, mais d'après nos expériences l'âge optimum semble se placer entre 3 et 6 heures.

La dose mise en oeuvre est de 0,1 cm3 exactement mesuré. Cette dose doit être rigoureusement respectée. Il est nécessaire avant d'ensemencer de transvaser la culture pour en

---

(1) NOTE - Monsieur PREVOT a eu l'obligeance de nous donner la souche de W. perfringens, ainsi que de nombreux renseignements concernant l'exécution de sa méthode, ce qui nous a permis de l'expérimenter nous-même.

Aussi sommes-nous heureuse de l'en remercier ici.

chasser les gaz. L'ensemencement doit se faire dans le bouillon à 37°. Il faut également avant de porter les tubes au bain-marie à 37° homogénéiser soigneusement leur contenu mais sans aérer, et c'est là un temps très délicat du dosage.

Interprétation des résultats.-

A. PREVOT admet que 0,1 cm3 de culture de W. perfringens est inhibé par 0,5 unité Oxford en moyenne. Néanmoins, la dose inhibante de Pénicilline peut varier légèrement selon l'âge de la culture de W. perfringens utilisée. Aussi doit-on avec chaque série de dosages faire le titrage d'une solution étalon.

Le volume total final dans les tubes est sans importance, seule compte la quantité de Pénicilline contenue dans chaque tube. Le dernier tube non décoloré contiendra donc 1 unité perfringens de Pénicilline. La valeur de l'unité perfringens sera donnée par le titrage de la solution étalon effectué parallèlement.

Par exemple, la solution étalon donne 1 UP = 0,4 U.I. (le dosage est fait sur une solution étalon à 1 UI/cm3 suivant la gamme 0,1 - 0,2 - 0,3 cm3 ....).

Si, pour la solution inconnue le dernier tube non décoloré correspond à 1/40 cm3 de liqueur à doser, c'est donc que 1/40 cm3 contient 1 U P, donc 0,4 UI et 1 cm3 = 0,4 x 40 = 16 U I.

La lecture des résultats doit se faire lorsque le témoin sans Pénicilline est complètement décoloré.

Cette méthode s'est montrée parfaitement satisfaisante pendant quelque temps, puis s'est révélée très irrégulière sans raison apparente, l'unité perfringens nous donnant, au cours d'une même semaine au fur et à mesure des repiquages du germe 0,6 puis 0,8 - 1 - 1,5 - 2,3 Unités internationales.

Monsieur A. PREVOT à qui nous avions rapporté ces faits nous fit savoir qu'il avait observé en même temps des faits identiques qu'il attribua à une mutation survenue dans la souche de W.p. qui se révélait donc en définitive trop instable pour être utilisée régulièrement dans les dosages. Aussi essaya-t-il d'autres germes et s'arrêta-t-il au Clostridium butyricum, germe stable, qui, employé rigoureusement dans les mêmes conditions que le W.p. en 2 heures donne un résultat, l'unité butyricum correspondant à 1 unité internationale environ (164).

5°) Inhibition de la phosphorescence.-

Il s'agit là d'une méthode indiquée par G. RAKE et C. M. MAC KEE et H. JONES (168) qui l'ont mise au point pour le dosage de l'acide aspergillique. Elle est basée sur l'action antiluminescente exercée sur le Photobactérium Fischeri par beaucoup de substances antibiotiques dérivées des moisissures et des actinomycètes, que ces auteurs avaient déjà observée (167)

La réaction se fait dans l'eau de mer naturelle ou artificielle additionnée de peptone, et la lecture du dosage est nette après 1/2 heure de bain-marie à 25° (elle doit se faire dans une chambre noire).

On recherche la plus grande dilution du produit à doser qui ne présente aucune luminescence.

Les auteurs de cette technique font remarquer qu'elle n'est pas applicable aux liqueurs de culture du Penicillium notatum Westling qui contiennent des substances inhibitrices de la luminescence autres que la Pénicilline. Par contre, elle serait utilisable au dosage des produits extraits purifiés de ces milieux de culture.

Sa limitation enlève son intérêt à cette méthode, du moins en ce qui concerne la Pénicilline, malgré l'avantage qu'il y a à faire un dosage en 1/2 heure seulement.

C - PROCEDES ENZYMATIQUES.-

Deux procédés de titrage de la Pénicilline utilisent des diastases, dans des buts rigoureusement opposés : dans l'un, la diastase (l'uréase) est inactivée par la Pénicilline et l'on mesure l'excès d'uréase, dans l'autre l'enzyme (la Pénicillinase) est utilisé comme destructeur de la Pénicilline et l'on dose l'acidité libérée dans la réaction.

1°) Inhibition de l'uréase par la Pénicilline.-

Cette propriété d'inactivation de l'uréase par la Pénicilline a été indiquée et mise à profit par J.C. TURNER, F.K. HEATH et B. MAGASANIK (210), spécialement pour doser de petites quantités de Pénicilline. On met en présence de l'uréase et la solution de Pénicilline à doser, et après un certain temps de contact, on mesure l'activité de l'uréase en ajoutant de l'urée et en dosant l'urée non touchée par l'uréase, par la quantité d'ammoniaque libérée (méthode de VAN SLYKE et CULLEN).

L'opération se fait avec 1 cm3 de solution à 0,05 pour 100 d'uréase dans une liqueur tampon à pH 7,3 et 0,25 cm3 de solution de Pénicilline. On laisse 2 heures en contact à 37°. On ajoute alors 5 cm3 de solution d'urée à 6 pour 100 et après 30 minutes à la température du laboratoire, on dose l'urée restante.

On opère parallèlement avec une solution de Pénicilline étalon.

Cette méthode intéressante par sa rapidité n'est, d'après ses auteurs eux-mêmes, pas absolument satisfaisante. Le taux d'inhibition varie avec l'acidification ou l'alcalinisation, le chauffage des solutions de Pénicilline, et surtout des échantillons utilisés. On se demande donc si l'inhibition de la diastase ne serait pas dûe, non à la Pénicilline elle-même, mais à ses impuretés.

Cette méthode n'est évidemment pas applicable au sang qui contient lui-même urée et uréase. M.E. FLOREY et H.W. FLOREY ont d'ailleurs remarqué qu'au cours d'un traitement à la Pénicilline le sang se chargeait en urée, probablement par inhibition de l'uréase in vivo (51).

L'inégalité des taux d'inhibition selon la Pénicilline rend cette méthode difficile à appliquer, aussi est-elle peu employée.

2°) Destruction de la Pénicilline par la Pénicillinase.-

J.J. MURTAUGH et C.B. LEVY (147) travaillant au laboratoire de recherches des Usines SCHENLEY sont les inventeurs de cette technique, une des plus récentes (1945) parmi les méthodes de titrage de la Pénicilline.

On fait agir à pH 8 de la Pénicillinase en quantité connue sur la solution de Pénicilline à titrer. Il se produit une baisse de pH car il y a formation d'un groupe acide au cours de l'inactivation de la Pénicilline par la Pénicillinase. On maintient le pH à 6,8 à l'aide de soude 0,02 N jusqu'à ce qu'il reste stable de lui-même : à ce moment la Pénicilline est complètement inactivée. On ajuste alors à pH 8. La baisse de pH, et par suite la quantité de soude ajoutée au cours de l'opération, est fonction de la quantité de Pénicilline à doser. Opérant parallèlement avec une solution étalon, on en déduit la quantité de Pénicilline contenue dans la solution inconnue.

Ce procédé présente l'avantage de ne nécessiter que très peu de temps, simplement celui d'un dosage chimique, par opposition aux méthodes biologiques mêmes rapides qui sont beaucoup plus lentes et nécessitent quelques heures. Mais il n'est applicable qu'aux produits purs, ce qui limite son champ d'application.

D - METHODES PHYSIQUES.-

1°) Dosage par polarimétrie.-

Les diverses Pénicillines ont à peu de chose près le même poids moléculaire, donc le même pouvoir rotatoire moléculaire.

T.G. GRENFELL, J.A. MEANS et E.W. BROWN (77) ont montré qu'il était possible de doser la Pénicilline par mesure du pouvoir rotatoire d'une solution comparativement avec une solution de Pénicilline Standard.

Cette technique est applicable à des produits titrant au moins 800 à 1000 unités au mg avec une précision de $\pm$ 3 pour 100.

2°) Dosage spectrographique en ultra-violet.-

Décrite par R.M. HERRIOT (93) cette technique consiste à chauffer la Pénicilline dans un tampon d'acétate à pH 4,6 et à déterminer au spectrophotomètre l'accroissement d'absorption ultra-violette.

E - METHODES CHIMIQUES.-

Méthode iodométrique de J.F. ALICINO.-

La technique donnée par J.F. ALICINO (3) réalise l'inactivation de la Pénicilline en solution par la soude. Il

se forme de l'acide pénicilloïque qui, après neutralisation, fixe l'iode; cette consommation d'iode est fonction du temps. On dose ensuite l'iode en excès par l'hyposulfite, et on en déduit la quantité de Pénicilline.

Cette méthode n'est pas applicable aux jus de culture mais seulement aux solutions déjà partiellement purifiées et d'une concentration supérieure à 1000 unités par cm3.

Cette technique a été appliquée par P. BOYMOND (8) aux produits galéniques.

D'après M. MUNDEL, H. FISCHBACH et T.E. EBLE (146) qui ont fait une étude comparative des méthodes à la pénicillinase, colorimétrique, spectrophotométrique et iodométrique, ce dernier procédé de titrage serait le meilleur.

F - METHODES PHYSICO-CHIMIQUES.-

Quatre procédés mettant en oeuvre des réactions colorées ont été indiqués :

1°) Méthode colorimétrique de J.C. ALLINSON.-

J.C. ALLINSON (4) consécutivement aux observations de E.P. ABRAHAM et des chimistes de l'équipe d'Oxford (1) a mis au point un procédé de titrage basé sur la propriété des hydrolysats acides de Pénicilline de donner une coloration bleu violet avec la ninhydrine; l'intensité de cette coloration est proportionnelle à l'activité antibactérienne. La mesure de la coloration se fait au spectrophotomètre.

J.C. ALLINSON a déterminé les conditions expérimentales optima du dosage : pH, durée de chauffage, température, données qui sont primordiales, car les résultats obtenus par cette méthode ne sont pas absolus et varient avec les conditions expérimentales.

Cette méthode n'est applicable qu'aux produits finis et ne peut être employée au titrage de liqueurs de culture ou d'extraction.

2°) Méthode colorimétrique de J.W. SCUDI.-

J.W. SCUDI (195) établit que dans des conditions déterminées, la Pénicilline donnait avec un dérivé de l'éthylène diamine, un azoïque rouge en milieu acide présentant un spectre d'absorption caractéristique. Cette réaction peut donner lieu à une évaluation quantitative, mais n'est applicable qu'aux Pénicillines pures et est d'un emploi délicat.

3°) Micro-méthode de J.W. SCUDI.-

J.W. SCUDI et V.C. JELINEK (196) ont donné une autre méthode proche de la précédente, basée sur la mesure de la fluorescence d'un composé obtenu par combinaison de la Péni-

cilline et d'un dérivé de l'aminoacridine. Cette méthode applicable aux produits purs permet de déceler moins de 1 mg de Pénicilline dans 1 cm3 avec une précision de ± 10 pour 100.

4°) Méthode colorimétrique de J.H. FORD.-

J.H. FORD (53) fait agir l'hydroxylamine sur la solution de Pénicilline à doser. Il se forme un acide hydroxamique, qui peut former avec un ion ferrique un complexe pourpre dosable colorimétriquement.

Cette réaction n'est pas spécifique de la Pénicilline, mais se fait également avec certains esters, anhydrides et amides. Aussi doit-on faire un témoin avec la même solution de Pénicilline dans laquelle la Pénicilline aura été préalablement détruite par la Pénicillinase.

Cette méthode présente l'intérêt d'après ses auteurs d'être utilisable pour les jus de culture. Elle semble cependant loin d'être définitivement au point.

G - CAS PARTICULIERS DU TITRAGE DES HUMEURS.-

S'il est indispensable de disposer de méthodes fidèles et suffisamment précises pour titrer la Pénicilline à toutes les phases de sa production, il est non moins nécessaire de pouvoir titrer les humeurs d'un organisme traité à la Pénicilline pour pouvoir suivre la dispersion et l'élimination de celle-ci et maintenir une dose thérapeutique suffisante.

Les méthodes que nous venons d'étudier ne sont pas toutes utilisables au titrage des liquides organiques principalement au sang. C'est ainsi que la méthode des tubes de HEATLEY ne peut pas être employée, les hématies se déposant à la surface de la gélose au fond du tube et faisant un joint étanche empêchant la diffusion du liquide dans la gélose; les résultats obtenus sont trop faibles. Pourtant d'après W.S. SHERWOOD et E. J. de BEER (198) on peut utiliser les disques de papier avec des résultats satisfaisants.

De plus, ces méthodes utilisent généralement des prises d'essais importantes (plusieurs cm3) et les prises d'essais de liquides organiques sont souvent restreintes, principalement pour le liquide céphalo-rachidien.

Ces considérations ont donné naissance à des méthodes spécifiques, généralement des microméthodes, que nous allons examiner rapidement :

a) Micro-méthodes.-

1°) Méthode de la cellule de A. FLEMING (Slide cell).-

A. FLEMING (46) a appliqué avec succès au titrage de la Pénicilline dans le sang, la technique que A.E. WRIGHT (230), seul d'abord, puis en collaboration avec L. COLEBROOK et E.J. STORER (29) avait établi dès 1923 pour mesurer le pouvoir bactéricide du sang de malades traités aux sulfami-

des ou à d'autres antiseptiques. Il s'agit de déterminer à l'aide de 2 lames séparées par d'étroites bandes de papier paraffiné de 0,1 mm d'épaisseur, 4 cellules de 50 mm3 de capacité. On dépose les diverses dilutions de sérum ou du sang à titrer dans les chambres ainsi préparées, on ensemence de la quantité convenable de Staphylocoques, et on fait incuber : le Staphylocoque pousse en donnant des colonies isolées, que l'on compte au microscope.

L'expérience est faite dans les mêmes conditions avec des dilutions connues d'une Pénicilline étalon.

En ce qui concerne la Pénicilline, on doit opérer avec le sérum et non le sang total, les globules rouges pouvant fixer jusqu'à 10 pour 100 de Pénicilline et les leucocytes pouvant détruire quelques bactéries comme l'ont fait remarquer C.H. RAMMELKAMP et C.S. KEEFER (170).

Pour chaque concentration de Pénicilline, il y a un nombre de bactéries survivantes pouvant arriver à croissance complète.

M.E. FLOREY et H.W. FLOREY (51) ont modifié cette technique pour n'utiliser qu'une goutte de sérum avec des dilutions successives : sur une lame on place 1 goutte de 5 à 10 mm3 de sérum à essayer et plusieurs gouttes de sérum ordinaire. On fait des dilutions en séries sur la lame, on ensemence, on recouvre chaque goutte d'une lamelle et l'on ferme chaque chambre à la cire.

Après incubation à 37° on compte le nombre de colonies pour chaque dilution et on compare avec 1 goutte de sérum ordinaire témoin ensemencé en même temps. C'est cette technique qu'emploie également L.P. GARROD (62).-

Mais A. FLEMING (47) remarqua qu'il était quelquefois difficile de voir si le Staphylocoque avait poussé ou non. Aussi fut-il amené à modifier sa technique, et à remplacer le Staphylocoque par un Streptocoque hémolytique en se servant de l'hémolyse comme test de culture. Ce procédé donne une lecture des résultats plus aisée et autorise de plus une marge plus large dans la densité de l'inoculum.

Dans sa technique définitive, A. FLEMING (48) fait 6 cellules par lame et non plus 4 comme A. WRIGHT; il fait des dilutions de sérum à doser dans de l'eau physiologique et ajoute à chaque dilution une quantité égale de sang humain défibriné et débarrassé de leucocytes, de façon à avoir un volume total de 25 mm3. Chaque dilution est additionnée d'une suspension de Streptocoques hémolytiques. Après fermeture des chambres, on fait incuber et après incubation on note l'hémolyse qui s'est produite lorsque la concentration en Pénicilline n'était pas inhibitrice. Dans le témoin fait parallèlement avec du sérum ordinaire, l'hémolyse doit être totale.

D.H. HEILMANN et W.E. HERREL (89) qui ont étudié cette dernière technique conservent la souche de Streptocoque hémolytique pendant plusieurs mois en petits tubes scellés, de préférence en présence de sérum de cheval, dans la neige carbonique.

2°) Méthode des tubes capillaires.-

En même temps qu'il étudiait le procédé de la "slide-cell", A. FLEMING opérait également en répartissant en tubes capillaires des dilutions progressives du sérum inconnu ensemencé de Staphylocoques dont on compte le nombre de colonies après incubation (46). Plus tard, J. FIELDING (43) ajoutait de l'indicateur d'Andrade dans les tubes et remplaçait la numération des colonies de Staphylocoques par l'observation des tubes ayant viré au rouge.

A. FLEMING et C. SMITH (50) dans une technique très proche de celle de J. FIELDING emploient un Streptocoque et utilisent le rouge de phénol comme indicateur qui vire au jaune par la pousse du germe.

A. FLEMING a également utilisé le test hémolytique (47). Ce dernier procédé étudié aussi par M.B. WOLOHAM, W.C. CUTTING, et M.V. CUTTING (228) est donné par ces auteurs comme satisfaisant pour des concentrations de 0,1 à 0,4 unité par cm3

Dans toutes les techniques utilisant des tubes capillaires, chaque tube remplace une chambre de la "slide-cell" et contient 25 mm3 de sérum à essayer, total ou dilué (la dilution était faite sur une lame), préalablement ensemencé.

Toutes ces méthodes comportent évidemment pour chaque série : une série étalon diluée à des taux connus, et un témoin en sérum ordinaire sans Pénicilline.

W.E. HERREL, D.R. NICHOLS et D.H. HEILMANN (92), qui ont comparé les diverses méthodes de titrage de la Pénicilline dans les liquides organiques ont conclu que la méthode de la "slide-cell" de A. FLEMING était la plus satisfaisante, parce que le sérum ne diminue pas la sensibilité du dosage, la stérilité n'est pas nécessaire, et que de très petites quantités de liquide suffisent.

Il faut néanmoins signaler au sujet de l'action du sérum sur la Pénicilline que tous les auteurs ne sont pas d'accord. Comme nous venons de le voir, W.E. HERREL, D.R. NICHOLS, et D.H. HEILMANN, ont trouvé le sérum sans action sur la Pénicilline. Ils s'accordent en cela avec M. KIESE (111) et avec E. P. ABRAHAM et l'école d'Oxford, mais non avec J.W. BIGGER (12). Ce dernier a constaté une inactivation nette de la Pénicilline par le sérum ou le sang total, le degré d'inactivation étant variable suivant les échantillons de sérum et suivant la température d'opération (plus élevé à la température du corps qu'aux basses températures). Il en conclut que l'on sous-estime généralement la quantité de Pénicilline existant dans le sérum d'un malade.

De même L.F. HOLMES et J.S. LOCKWOOD (100) admettent l'existence dans le sérum sanguin d'une antipénicilline qu'ils purent obtenir en dialysant le sérum. Cette antipénicilline résiste à un chauffage de 60° pendant 30 minutes, mais est détruite à 100° en 1 minute.

Ces diverses considérations contradictoires engagent donc à être extrêmement prudent, chaque fois que l'on aura des titrages de cette sorte à effectuer.

b) Macro-méthodes.-

3°) Méthode turbidimétrique.

W.A. RANDALL, C.W. PRICE et H. WELCH (176) ont essayé d'appliquer les techniques turbidimétriques aux liquides organiques, mais sans succès car il y aurait d'après leurs expériences stimulation apparente des microorganismes par le sérum ce qui rend les mesures irrégulières. Cependant N.G. HEATLEY, signale l'existence d'un germe insensible à l'action du sérum, le Streptococcus dysgalactiae (86).

4°) Méthode des dilutions.-

Ces mêmes auteurs sont ensuite revenus à la méthode des dilutions qu'ils jugent la plus satisfaisante, à condition d'employer le Streptocoque hémolytique comme le fait C.H. RAMMELKAMP (169), et dont P. ROSENBLATT et ses collaborateurs ont donné une réalisation pratique (185).

Cependant ils ont essayé d'autres germes pénicillinosensibles et ont eu de bons résultats avec un Bacillus subtilis. Ils opèrent toujours par dilutions successives, dans des tubes à hémolyse où ils ne mettent que 0,5 cm3 de bouillon et 0,5 cm3 du liquide à titrer.

Mais, d'après C.E. BUGGS et collaborateurs (22) il faut être très prudent dans l'emploi de B. subtilis qui serait inhibé par certaines substances du sérum normal, V.L. CHANDLER, C.W. PRICE et W.A. RANDALL donnent une technique de mesure du pouvoir antisubtilis du sérum (27).

5°) Méthode au Streptocoque hémolytique.-

Il s'agit ici simplement de la méthode hémolytique classique que C.H. RAMMELKAMP (169) a appliquée aux liquides organiques et qui s'est révélée suffisamment sensible pour déceler 0,0038 unité de Pénicilline dans 0,2 cm3 de liquide à doser.

W.M.M. KIRBY et L.A. RANTZ (118) proposent de supprimer l'effet stimulant du sérum sur la pousse du germe en ajoutant à la solution standard du sérum du même malade avant traitement. Il est évidemment souvent difficile d'en disposer.

6°) Méthode à la réductase.-

R.D. REID et J.H. BREWER (180) se sont inspirés de la réaction classique de réduction du bleu de méthylène pour l'estimation de la pureté du lait, qu'ils ont adaptée au titrage de la Pénicilline dans les liquides organiques.

La réaction se fait avec de très petites quantités de dilution convenable du liquide à titrer auquel on ajoute 1,5 cm3 d'un milieu à base de poudre de lait et coloré au bleu de méthylène, ensemencé à l'aide de Bacillus subtilis.

Après incubation à 37°, la lecture des résultats est faite à la 4ème, 5 ou 6ème heure et à la 18ème heure.

Le dernier tube coloré en bleu marque la limite active de la Pénicilline.

7°) Méthode de Y. CHABBERT et B. SUREAU.-

B. SUREAU, F. DEPIN et O. SCHURR (205) d'une part, et Y. CHABBERT et B. SUREAU (25) de l'autre, ont utilisé les techniques classiques, technique par dilution et technique de la slide-cell en y apportant une modification facilitant la mise en évidence de l'inhibition : ils ajoutent soit dans les tubes, soit dans chacune des cellules de la slide-cell une solution sucrée additionnée d'un indicateur de pH. C'est le glucose en présence de phénol sulfonephtaléine qui a donné les meilleurs résultats : dès qu'il y a pousse du germe test-Staphylocoque, l'indicateur vire du rose franc au jaune citron.

Cette technique est sensible à 0,02 unité par cm3. Elle est également applicable à la Streptomycine (26).

Néanmoins, il faut être extrêmement prudent quand on étudie la Pénicillinémie. L'effet du sérum ou du sang total dans les titrages est variable selon la concentration en Pénicilline et les auteurs qui en ont fait l'étude critique, H. VELU et D. CHABANAS (213), R.E. DOLKART, F.D. DEY et G.X. SCHWENLEIN (36), W.F. ELIAS, H.Y. MERRION et T. SPEICHER (39) concluent à l'incertitude de toutes les méthodes essayées.

H - TITRAGE DIFFERENTIEL DES PENICILLINES.-

On sait qu'il existe plusieurs variétés de Pénicillines qui diffèrent entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et par leur action in vivo.

De nombreux travaux ont été faits concernant leur titrage différentiel aussi bien physique ou chimique que biologique, et particulièrement pour la Pénicilline G, la plus active in vivo.

1°) Dosages spectrographiques.-

a) en ultra-violet (Pénicilline G).-

T.C. GRENFELL et ses collaborateurs (77) ont imaginé une technique basée sur le fait que le spectre d'absorption du sel de sodium de Pénicilline G pure présente deux sommets caractéristiques à 2585 et 2645 Å. Dans la même région les autres Pénicillines ont une absorption faible à cette longueur d'onde. Pourtant la présence de plus de 1 pour 100 de Pénicilline X amène des perturbations dans le dosage de la Pénicilline G.

b) en infra-rouge (Pénicillines G.F.X.K.).-

Indiquée par R.B. BARNES et ses collaborateurs (7) la méthode est basée sur l'établissement des spectres d'absorption en infra-rouge des sels de sodium de Pénicilline G, F, X, K, qui sont caractéristiques de chacune d'elles et permet leur dosage dans un mélange.

2°) Dosages chimiques.-

a) A la N-éthyl-pipéridine (Pénicilline G).-

Ce dosage mis au point par J.C. SHEEHAN, W.J. MADER et D.J. CRAM (197) concerne la Pénicilline G seule. Il consiste dans la précipitation du sel de N-éthylpipéridine de Pénicilline G en milieu acide. On recueille le sel après cristallisation et on le pèse après dessication.

b) Par extraction chloroformique (Pénicilline G et K)

WRIGHT et GROVE (231) dosent dans des échantillons commerciaux les Pénicillines G et K par extraction différentielle au chloroforme à pH 6 : ils ont démontré qu'à ce pH, on extrait dans le chloroforme 31,4 pour 100 de Pénicilline K et seulement 1,5 pour 100 de G, alors que la phase aqueuse contient presque toute la Pénicilline G et 68,5 pour 100 de Pénicilline K.

L'activité en unité de Pénicilline de chacune des phases est titrée par iodométrie et les auteurs de la méthode donnent une formule permettant d'en déduire le pourcentage des Pénicillines G et K dans l'échantillon étudié.

3°) Procédés chromatographiques.-

a) Chromatographie sur silice.-

H. FISCHBASH (44) réalise une chromatographie classique sur gel de silice tamponné. Les Pénicillines se séparent bien; la Pénicilline K donne la bande la plus basse, puis F, F' et enfin G. On récupère ainsi 98 pour 100 de K et de G, mais seulement 80 à 85 pour 100 de F, F'.

L'évaluation quantitative de chacune des Pénicillines se fait par titrage des éluats. L'élution doit être faite à l'éther qui enlève les diverses Pénicillines les unes après les autres, en fonction du volume d'éther qui est passé à travers la colonne.

b) Chromatographie sur papier filtre.-

S'inspirant de la chromatographie sur papier pour la séparation des acides aminés, R.R. GOODALL et A.A. LEVI (63) (64) ont remplacé le gel de silice par un papier filtre de qualité déterminée que l'on découpe en bandes et imprègne de solution tampon phosphatée à pH 6,7. La méthode est basée sur les différences de distribution des Pénicillines entre l'éther (phase mobile) et le tampon phosphaté (phase immobile) supporté par la bande de papier filtre. Chaque bande reçoit près d'une extrémité 1 microgoutte de la solution à étudier convenablement diluée. Cette extrémité est mise à tremper dans un récipient contenant de l'éther qui descend progressivement le long du papier.

On met en évidence la distribution des Pénicillines, le long des bandes, en les portant sur une plaque d'agar ensemencée de Bacillus subtilis. Après incubation à 37°, on voit

apparaître le long des bandes des zônes d'inhibition elliptiques. La Pénicilline X qui ne diffuse pas reste au point d'inoculation, puis vient la Pénicilline G, puis F et F' et enfin K.

On mesure le petit diamètre de chaque ellipse d'inhibition et on calcule sur une courbe standard l'activité correspondant à chaque zône. On peut alors établir le pourcentage de Pénicilline par rapport à l'activité totale.

W.R. WINSTEN et A.H. SPARK (227 bis) en utilisant l'acétate d'amyle au lieu d'éther ont ainsi mis en évidence 11 sortes de Pénicillines.

4°) Titrages bactériologiques.-

W.H. SCHMIDT, G.E. WARD et R.D. COGHILL (193) remarquant que l'activité d'un échantillon de Pénicilline est variable selon le germe d'essai et les sortes de Pénicillines qu'il contient, étudièrent les activités relatives des Pénicillines F et X, en prenant comme Standard la Pénicilline sodique G cristallisée. L'essai fut fait par la méthode de HEATLEY sur le Staphylocoque et le Bacillus subtilis (formes R et S).

C'est ainsi que W.H. SCHMIDT et ses collaborateurs notèrent que l'activité n'est plus la même, sur les formes R et S, pour la Pénicilline X et qu'ils établirent des rapports permettant de calculer la composition d'un échantillon inconnu en faisant son titrage sur ces deux germes :

			Pénicilline F	Pénicilline X
Rapport	$\frac{\text{Subtilis S}}{\text{Staphylocoque}}$	=	0,65	0,95
	$\frac{\text{Subtilis R}}{\text{Staphylocoque}}$	=	0,65	1,42 à 2,0

En faisant ces titrages par dilutions K. HIGUCHI, W. H. PETERSON d'abord (94), puis R. DONOVICK, D. LAPEDES et F. PANSY ensuite (37) ont également établi des formules et graphiques d'après les résultats obtenus avec des Pénicillines pures seules ou mélangées en proportions connues, titrées sur 3 germes : "Staphylococcus aureus, Bacillus brevis et organisme "E" de W.H. PETERSON. Ils ont montré également que dans un mélange de Pénicillines les activités antimicrobiennes ne s'additionnent pas.

Assez compliquées ces techniques ne sont pratiquement pas utilisées. La méthode chromatographique sur papier de R.R. GOODALL et A.A. LEVI est certainement la plus employée industriellement pour établir les pourcentages des diverses Pénicillines au cours d'une fabrication.

II - CRITIQUES RAPIDES DES METHODES EXPOSEES

Le but de notre travail était de rechercher et mettre au point une méthode de titrage de la Pénicilline aisément utilisable dans l'industrie. Il fallait donc qu'elle soit simple et qu'elle n'exige pas de matériel spécialisé plus ou moins compliqué, fragile et difficile à se procurer, et qu'elle puisse, avec un rendement et une précision satisfaisante, être mise dans les mains de laborantines.

Nous avons donc examiné toutes les méthodes de titrage existantes.

A - METHODES PAR DIFFUSION.-

La difficulté commune à toutes ces techniques, qu'elles utilisent des cylindres ou des disques de papier, est incontestablement la mesure du diamètre des zones d'inhibition.

Pour être aussi exacte que possible, il est nécessaire de la faire par transparence à l'aide d'un appareil à éclairage inférieur muni d'un verre portant une échelle millimétrique sur lequel on pose les boîtes, ou bien encore en photographiant les zones inhibées. La mesure au compas à pointes sèches est beaucoup trop longue et imprécise. Mais quel que soit le procédé utilisé, il reste toujours difficile de mesurer les zones d'inhibition à bords mal définis comme cela peut arriver, si de l'eau de condensation retombe sur la gélose au cours de l'incubation.

De plus, la netteté des zones est fonction entre autres de la régularité de l'épaisseur de la gélose. Il faut donc disposer de boîtes de Pétri, à fond parfaitement plat, ce qui n'est jamais le cas des boîtes que l'on trouve couramment dans les laboratoires.

Quant à la méthode de J. BRODIE en petits tubes, nous n'insisterons pas sur l'imprécision et la difficulté du repérage de la plus haute colonie de Staphylocoque et la mesure de la distance de celle-ci au ménisque de gélose.

La nécessité de disposer d'un matériel conçu spécialement et la difficulté de se le procurer en temps de guerre ou d'après-guerre nous a conduit à rechercher une méthode plus pratique que celles-ci.

B - METHODES PAR DILUTION.-

Les méthodes opacimétriques dans lesquelles l'inhibition est appréciée au photomètre sont très séduisantes en raison de leur rapidité. Elles présentent l'inconvénient d'exiger cet appareil coûteux qu'est le photomètre.

Nous ne pouvions d'ailleurs pas envisager de les étudier lorsque nous avons entrepris nos recherches car elles sont toutes postérieures au début de nos travaux.

Plusieurs autres méthodes s'éliminent d'elles-mêmes quand il s'agit de pratique industrielle, car elles ne représentent que des techniques curieuses et très délicates de laboratoire.

C'est le cas tout d'abord de la méthode de titrage sur milieu de culture de tissus dont les matières premières sont difficiles à se procurer, d'un prix de revient excessif, et la préparation du milieu très longue.

C'est aussi celui de la méthode sur oeuf embryonné qui constitue également une matière première délicate à préparer et très coûteuse; de plus, l'oeuf embryonné a l'inconvénient de représenter un milieu non défini qui peut varier beaucoup pour une très petite différence dans la durée ou la température d'incubation, car les tissus embryonnaires se modifient vite, et de présenter un volume trop imprécis. Il faut également insister sur le fait qu'on s'adresse ici à un organisme vivant et faire intervenir la notion de dose minima active; l'organisme par un mécanisme de défense naturelle détruit une partie de l'inoculum microbien et la dose ainsi détruite dépend de la dose d'ensemencement. Cette action vient donc s'ajouter à celle de la Pénicilline et troubler inévitablement les résultats. Le titrage du Standard fait évidemment sur un autre oeuf sera à peu près certainement réalisé dans des conditions différentes du titrage inconnu.

Si l'on considère la méthode respirométrique, on est tout de suite frappé par l'appareillage qu'elle nécessite; les appareils de WARBURG sont assez compliqués et très coûteux, et la technique respirométrique elle-même exige la simultanéité de plusieurs mesures, ce qui implique de nombreux appareils de WARBURG pour un seul titrage.

La méthode hémolytique est intéressante parce qu'elle donne un résultat en quelques heures. Néanmoins les préparatifs préliminaires sont très longs (lavage des globules - numération des germes).

Il faut de plus attirer l'attention sur le fait qu'il est toujours très délicat d'entretenir le pouvoir hémolytique d'une souche de Streptocoque et que la manipulation d'une telle souche peut être dangereuse dans un laboratoire de titrages en série.

La difficulté de l'entretien de la souche nous a fait également éliminer la méthode de A. PREVOT sur les anaérobies; comme nous l'avons déjà fait remarquer les souches d'anaérobies sont sujettes à des mutations imprévisibles, et il n'est pas possible de contrôler toute une fabrication dans ces conditions. De plus, le mode opératoire lui-même présente quelques complications particulièrement pour homogénéiser le contenu du tube, après distribution de la liqueur à titrer et ensemencement, sans aérer le milieu.

C - METHODES PHYSIQUES ET CHIMIQUES.

ET

D - PROCEDES ENZYMATIQUES.-

Parmi les autres méthodes que nous avons exposées, aucune ne pouvait retenir notre attention pour le but que nous nous étions proposé. En effet, que ce soit la technique de réduction des nitrates, par ailleurs très délicate à appliquer et ne pouvant être mise qu'en des mains très expérimentées, ou encore la méthode d'inhibition de la phosphorescence, les procédés enzymatiques ou les procédés colorimétriques et chimiques, tous ces procédés de titrage ne s'appliquent qu'à des Pénicillines pures suffisamment concentrées, et ne peuvent être employées au contrôle des cultures.

Le cercle était donc assez restreint des méthodes d'application facile au contrôle de la fabrication de Pénicilline à toutes ses phases, ne nécessitant pas d'appareillage spécialisé, toujours coûteux, difficile à se procurer et souvent délicat à utiliser.

Il restait, répondant de prime abord à ces caractéristiques, la méthode de dilution dite méthode d'Oxford. Nous avons opté pour celle-ci, qui a l'intérêt de donner directement un résultat par observation à l'oeil nu. Nous allons donc l'exposer en détails telle qu'elle a été conçue par les différents chercheurs, puis nous exposerons nos recherches personnelles à ce sujet.

III - TITRAGE DE LA PENICILLINE PAR LA METHODE D'OXFORD

La méthode des dilutions inspirée des techniques bactériologiques classiques est l'une des plus anciennement utilisée au titrage de la Pénicilline.

C'est sur ses données expérimentales que fut établie la seconde Unité Oxford telle que l'ont définie H.W. FLOREY et M.A. JENNINGS (52), la plus petite quantité de Pénicilline, qui dissoute dans 50 cm3 de bouillon nutritif, inhibe complètement la croissance de la souche témoin de Staphylococcus aureus dans des conditions expérimentales déterminées.

Cette définition ne comporte pas la comparaison avec un Standard de Pénicilline. Elle diffère en cela de la première définition qu'avait donnée E.P. ABRAHAM en 1941 : "l'unité Oxford" est la quantité de Pénicilline qui dissoute dans 1 cm3 d'eau donne la même inhibition qu'une certaine préparation Standard partiellement purifiée, détenue par les laboratoires d'Oxford.

Comme nous aurons l'occasion de le voir, l'unité de Pénicilline définitivement choisie est représentée maintenant par un poids fixé de Pénicilline pure cristallisée, et tout titrage comporte nécessairement la comparaison avec ce Standard.

Etudions d'abord les conditions expérimentales qu'ont réalisées les divers chercheurs.

1°) PRINCIPE DE LA METHODE.-

Un bouillon nutritif ensemencé de Staphylocoques et placé à 37° pendant 24 heures se trouble uniformément. Si l'on ajoute avant la mise à incuber une quantité convenable de Pénicilline, le Staphylocoque ne se développe pas, et le bouillon reste limpide.

On recherchera donc pour un échantillon inconnu la plus grande dilution à laquelle il empêche encore la croissance du Staphylocoque dans des conditions expérimentales définies

Les différents paramètres qui vont entrer en jeu dans un titrage apparaissent immédiatement très nombreux, composition du milieu d'essai, souche de Staphylocoque, durée d'incubation, appréciation des résultats.

Certains d'entre eux ont été étudiés isolément, par divers auteurs, mais leur ensemble n'a pas fait l'objet d'une étude homogène. C'est le but que nous avons poursuivi dans les recherches que nous exposerons ultérieurement après avoir fait part des points étudiés jusqu'alors.

2°) COMPOSITION DU MILIEU D'ESSAI.-

Le Staphylocoque doré qui est l'organisme test de la méthode d'Oxford est un germe de culture facile. Néanmoins, tous les chercheurs qui ont utilisé cette méthode emploient des milieux très complexes généralement à base d'extraits de viande Cependant, A. FLEMING (45) propose comme bouillon de titrage une eau peptonée glucosée salée de composition simple :

- Peptone Evans ..... 1 g.
- Chlorure de sodium ..... 0,50 g.
- Glucose ..... 1 g.
- Eau q.s. pour 100 cm3

Il fait remarquer, en même temps, qu'il y aurait avantage à standardiser le bouillon employé, car les peptones n'ont pas la même valeur nutritive selon leur origine, et le changement d'échantillon de peptone entraînera des variations de valeur du bouillon.

C.G. POPE et M. STEVENS (159) emploient un lysat papaïnique de viande de cheval concentré, dilué extemporanément de façon à avoir un bouillon contenant 5 mg d'azote total par cm3.

W.R. BOON se sert au contraire, comme A. FLEMING, d'un milieu à base de peptone, mais additionné d'extraits de viande et de levure de composition suivante :

- Peptone ..... 1 g.
- Marmite ..... 0,15 g.
- Lemco ..... 0,30 g.
- Chlorure de sodium ..... 0,35 g.
- Glucose ..... 0,1 g.
- Eau distillée q.s. pour ..... 100 cm3.

W.H. SCHMIDT et A.J. MOYER (192) utilisent un milieu riche de composition suivante :

- Bacto peptone ..... 5 g.
- Bacto extrait de levure ..... 1,5 g.
- Bacto extrait de boeuf ..... 1,5 g.
- Glucose commercial hydraté .... 1 g.
- Chlorure de sodium ..... 3,5 g.
- Tampon phosphaté à 1 pour 100 à pH 7 ..... 500 cm3
- Eau distillée q.s. pour ..... 1000 cm3.

Le tampon phosphaté est préparé en dissolvant 2,63 g. de phosphate mono potassique et 7,36 g de phosphate bipotassique dans 1000 cm3 d'eau distillée.

Enfin, J.W. FOSTER et H.B. WOODRUFF (56) se servent d'un bouillon au coeur de boeuf dans lequel la culture microbienne présente la particularité de se sédimenter, ce qui serait un avantage au moment de la lecture des résultats.

Autour de ces quelques milieux de base, nombreux sont les auteurs qui ont recherché le milieu le plus favorable à la pousse du Staphylocoque, à l'action de la Pénicilline et à l'observation du résultat.

M. KIESE (111) dans une étude générale sur la chimiothérapie des antibiotiques constate que l'inhibition du Staphylocoque par la Pénicilline n'est pas empêchée par le sérum ou le sang.

De nombreux auteurs, parmi lesquels il faut citer spécialement G.L. HOBBY, et M.H. DAWSON (97), S.W. LEE et ses collaborateurs (125), C. LEVADITI (129), E.W. TODD (208) ont fait remarquer que la bactériolyse par la Pénicilline dépendait de la phase de la culture du microbe. La lyse est plus rapide quand les organismes sont dans la phase de multiplication logarithmique. Aussi fut-on amené à additionner le milieu de titrage de substances favorisant la multiplication microbienne et devant donc augmenter l'action de la Pénicilline. C'est ce que constatèrent tout d'abord G.L. HOBBY et M.H. DAWSON (98) pour le sérum et le glucose.

C.P. MILLER et A.Z. FOSTER (141) poursuivant également des recherches sur l'action du sérum confirment ces résultats non plus sur le Staphylocoque, mais sur le Méningocoque, et précisent même que cette action favorisante serait dûe au complément du sérum.

Cependant l'opportunité de l'addition de sérum au milieu de titrage reste discutée, car J.W. BIGGER (12) et H. EAGLE (38) démontrent au contraire que la Pénicilline est inactivée par celui-ci, l'inactivation variant d'ailleurs avec les échantillons de sérum et la température d'expérimentation.

D'après W.A. RANDALL et ses collaborateurs (177) le degré d'inactivation par le sérum ou les émulsions d'organes dépendrait également de la Pénicilline, mais la différence entre les degrés d'inactivation des diverses Pénicillines n'est pas suffisante pour en permettre la détermination du pourcentage dans un échantillon donné.

Cette action a d'ailleurs été également étudiée par R. TOMPSETT, S. SCHULTZ et W. MAC DERMOTT (209).

A.G. LOCHHEAD et H. TIMONIN (134) qui ont étudié l'influence du glucose, concluent qu'il augmente le pouvoir antibiotique de la Pénicilline en rendant bactériostatiques de très faibles concentrations qui ne le sont pas en son absence. Mais il semble que ces auteurs se soient adressés dans leurs travaux non pas à la Pénicilline, mais à de la Notatine qui répond aux propriétés qu'ils donnent.

3°) REALISATION PRATIQUE DES DILUTIONS.-

On ne trouve dans la littérature que de très rares indications sur les gammes de dilutions qu'ont employées les divers expérimentateurs.

Le volume de bouillon dans les tubes à expérience varie de 1 cm3 dans la technique de C.M. MAC KEE (137) à 20 cm3 dans celle de G.S. POPE et M.F. STEVENS (159).

C.M. MAC KEE et ses collaborateurs réalisent une gamme de dilutions en progression géométrique, où le produit à titrer se trouve dilué à 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32... dans un volume final que l'on ajuste à 1 cm3.

J.V. COCKE (30) se sert également d'une gamme à progression géométrique. P. BONET-MAURY (15) choisit les dilutions progressives de 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 avec un volume final constant, ou bien encore dispose dans les tubes de la réaction des concentrations présentant entre elles une différence constante, c'est-à-dire se suivant en progression arithmétique : 1 cm3, 0,9, 0,8, 0,7 ...

C.G. POPE et M.F. STEVENS ont donné à l'Organisation d'hygiène de la Société des Nations une technique détaillée : ils opèrent dans un volume total de 22 à 20 cm3, en ajoutant à 20 cm3 de bouillon des quantités décroissantes de la dilution à 1/11 d'une solution à 5 unités par cm3. Le taux de dilution obtenu est calculé ensuite.

On a par exemple :

- Volume en cm3 ajouté à 20 cm3 de bouillon	2	1,8	1,6	1,4
- Dilution obtenue	1/11	1/12,1	1/13,4	1/15,2

R. JACKSON (103) utilise une technique très voisine où la dilution de départ est faite à 1/10 et non plus 1/11 et où tous les tubes sont amenés au volume final uniforme de 20cm3 exactement. Les taux de dilution ainsi obtenus sont plus simples, mais l'opération beaucoup plus longue.

W.H. SCHMIDT et A.J. MOYER (192) font varier en même temps la quantité de bouillon et celle de solution à titrer par tube de culture; ils ensemencent leur bouillon de titrage à raison de 1 cm3 de culture en bouillon de 20 heures de Staphylococcus aureus pour 200 cm3 de milieu, et préparent une série de tubes stériles en introduisant dans chaque tube une

quantité de bouillon ensemencé suivant le tableau n° 1, ci-après; ils ajoutent ensuite 1 cm3 de l'échantillon à titrer dans le premier tube, dont le mélange est ensuite utilisé pour la répartition des suivants :

TABLEAU N° 1

Technique de dilution de W.H. SCHMIDT et A.J. MOYER

Numéro du tube	Volume de bouillon ensemencé	Volume d'échantillon à titrer	Dilution finale
1	9 cm³	1 cm³	1/10
2	9	1 cm³ de tube N° 1	1/100
3	4	1 cm³ de tube N° 2	1/500
4	5	d°	1/600
5	6	d°	1/700
6	7	d°	1/800
7	4	0,5 cm³ du tube 2	1/900
8	4,5	d°	1/1000
9	5	d°	1/1100
10	5,5	d°	1/1200

Il n'y a donc pas deux tubes consécutifs d'un titrage qui présentent le même volume.

4°) GERME UTILISE.-

Après avoir réalisé les dilutions selon la gamme adoptée, on ensemence chaque tube du titrage. Le germe choisi est le Staphylocoque doré, mais il ne faut pas s'adresser à n'importe quelle souche. En effet, C.H. RAMMELKAMP et T. MAXON (171) remarquèrent qu'in vivo la Pénicilline n'était pas toujours aussi active dans toutes les infections à Staphylocoques. Cette différence s'atténue in vitro, mais il existe néanmoins des Staphylocoques résistants, ce que constatèrent également A. FLEMING et ses collaborateurs (49) ainsi que W.M. KIRBY (117) d'une part, et W.W. SPINK et V. FERRIS (203) (204) d'autre part qui pratiquèrent l'extraction d'une substance inhibitrice de la Pénicilline à partir de germes résistants.

La résistance d'une souche à la Pénicilline peut d'ailleurs être acquise par repiquages successifs du germe dans des bouillons contenant des doses croissantes de Pénicilline, comme l'ont réalisé C.M. MAC KEE et C.L. HOUCK (136), R.J. SCHNITZER et ses collaborateurs (194), G.P. YOUMANS et ses collaborateurs (232).

J.W. BIGGER (13) et R. BRUYNORGHE (21) font encore u-

ne place spéciale aux Staphylocoques qu'ils appellent "persistants". Ce sont des germes qui échappent toujours à l'action de la Pénicilline par un mécanisme inconnu.

Toutes ces remarques prouvent l'importance du choix de la souche dans les titrages de Pénicilline, et l'intérêt qu'il y a à utiliser à l'intérieur d'un même laboratoire toujours la même souche.

La Commission du Bureau d'Hygiène de la Société des Nations réunie au mois d'Octobre 1944 fixa les souches officielles de Staphylococcus aureus qui sont également sensibles à l'action inhibitrice de la Pénicilline F et à celle de la Pénicilline G.

Ce sont :

1) N° 6571 de la "National Collection of Type Cultures" (Angleterre) -
N.R.R.L. - B - 314 (Etats-Unis d'Amérique)

2) N° 209. P de la "Food and Drug Administration". (Etats-Unis d'Amérique).
N.R.R.L. - B - 313 (Etats-Unis d'Amérique).

Aucune précision n'a été donnée sur la façon de les entretenir.

L'importance de l'inoculum d'ensemencement de chacun des tubes de titrage n'est généralement pas spécifiée. G. L. HOBBY et ses collaborateurs (99) utilisent 2 à 4 millions de germes par tube. C.M. MAC KEE (137) qui opéra dans le petit volume de 1 cm3 ne met en oeuvre que 500 germes, soit 0,5 cm3 d'une dilution à 10^{-6} d'une culture de 6 heures. C.G. POPE et M.F. STEVENS ensemencent à l'aide d'un fil de platine trempé dans une suspension nettement trouble d'une culture de 24 heures sur agar. Ils font d'ailleurs remarquer, ainsi que L.A. RANTZ et W.M.M. KIRBY (178) que le nombre de germes mis en oeuvre est d'une importance secondaire et n'influe pas sur le résultat final.

5°) LECTURE DE L'INHIBITION.-

On ne trouve que de très rares indications sur la durée d'incubation et l'appréciation de l'inhibition à la fin de celle-ci. Quoi qu'il en soit, la rigueur de l'appréciation exige une pousse nette du germe puisqu'il s'agit d'une estimation à l'oeil nu. Celle-ci ne sera donc possible que lorsque la pousse du tube témoin sans Pénicilline aura atteint son maximum d'opacité.

C.G. POPE et M.F. STEVENS (159) estiment que 16 heures à 37° représentent une durée convenable.

R. JACKSON (103) ne donne qu'une indication approximative de 15 à 18 heures d'incubation et fait deux lectures séparées par un intervalle de 2, 3 heures, la moyenne de ces lectures étant prise comme l'expression du résultat expérimental. Cet auteur signale que l'apparition du point limite de croissance demande des temps un peu variables selon la peptone

employée à la préparation du bouillon de titrage, ce qui peut justifier un changement dans la durée d'incubation.

Il est en tout cas important de réaliser une incubation assez longue, car la lecture à l'oeil nu, après quelques heures seulement, ne peut donner aucun résultat.

Les expériences de L.B. SMITH et T. HAY (202) d'abord puis celle de F. NITTI, J. FOSSAERT et M. FAGUET (149) et (150) nous ont appris qu'au début de l'incubation, il y avait d'abord pousse du Staphylocoque puis ensuite lyse aux concentrations inhibitrices. Cette lyse ne débute que vers la 5ème heure. Le seuil d'inhibition ne peut s'observer aisément que lorsque celle-ci est complètement terminée.

La notion du seuil d'inhibition ou de point limite est d'ailleurs assez mal précisée en général.

Au-delà de la concentration limite inhibitrice, à 1/10 et même 1/50 de cette concentration, la Pénicilline agit encore, et bien qu'incapable de détruire totalement les germes, elle en altère la morphologie pour produire des formes d'involution géantes ou enflées qu'ont observées A. FLEMING et ses collaborateurs (49) ainsi que D. GARDNER (59). Les tubes de telles cultures ont une opacité intermédiaire entre le tube complètement clair et le témoin sans Pénicilline.

L'existence d'une zône d'inhibition progressive, qui n'existe pas dans tous les titrages, rend difficile le choix du point limite et explique les variantes rencontrées dans son appréciation.

A. FLEMING (45) choisit comme point limite le premier tube présentant une culture visible à l'oeil nu. La quantité de Pénicilline existant dans le produit à titrer se trouve donc ici surestimée. Cette surestimation sera d'autant plus importante que l'écart entre deux dilutions successives est plus grand. Mais pour faciliter la mise en évidence de la plus petite trace de culture, il se sert de l'indicateur d'Andrade (solution de fuchsine acide à 1 pour 100 environ additionnée de 17 pour 100 de soude N, ajoutée au bouillon de titrage à raison de 1 cm3 d'indicateur pour 100 cm3, le pH du milieu étant ajusté vers 7,2 à 7,4).

La pousse du Staphylocoque acidifie le milieu et provoque le virage de l'indicateur jaune en milieu alcalin qui devient rouge à la plus légère acidité. Le point limite choisi par A. FLEMING est représenté par le premier tube montrant une coloration rouge, c'est-à-dire le premier tube présentant une culture.

W.H. SCHMIDT et A.J. MOYER (192) font la lecture soit après 18 heures de culture à 37°, soit après 40 heures. Par comparaison avec la méthode de HEATLEY, ils établissent que dans leur technique par dilution, il faut environ avec lecture à la 18ème heure 0,045 unité par cm3 pour inhiber le germe. Pour convertir les dilutions en unités, il suffit de multiplier l'inverse de la dilution par le facteur 0,045.

L'incubation de 40 heures faciliterait la lecture, un tube de la série étant très clair et le suivant très nettement trouble. Comme, en prolongeant l'incubation, la quantité de Pé-

nicilline nécessaire pour inhiber la croissance augmente ils établissent qu'il faut environ 0,1 unité par cm3 pour avoir une inhibition totale. Leur facteur de correction est donc dans ce cas 0,1.

Enfin, signalons que C.G. POPE (158) fait après 18 heures d'incubation la lecture au photomètre. Cette technique cumule l'inconvénient de la méthode des dilutions (incubation prolongée) et celui de la turbidimétrie (mesure photométrique).

6°) INTERPRETATION DU RESULTAT OBSERVE - UTILISATION DE L'ETALON.

Une fois connu le taux de dilution limite actif du produit à titrer, il reste à le traduire en unités de Pénicilline. Cette évaluation a d'abord été faite en comparaison avec une Pénicilline impure utilisée arbitrairement comme étalon par les premiers chercheurs de l'équipe d'Oxford. Puis, M.B. FLOREY et M.A. JENNINGS (52) ont pensé pouvoir supprimer la nécessité du Standard en fixant l'unité Oxford de Pénicilline comme la quantité de produit qui, dissoute dans 50 cm3 de bouillon à l'extrait de viande, inhibe complètement la culture de la souche témoin de Staphylococcus aureus.

Mais ce qui était probablement régulier et valable dans le laboratoire d'Oxford ne l'était plus dans les autres laboratoires où les conditions expérimentales ne pouvaient être rigoureusement identiques.

Aussi la nécessité absolue d'un étalon de référence s'est-elle à nouveau imposée. Lors de la Conférence Internationale pour la standardisation de la Pénicilline qui s'est tenue à LONDRES du 16 au 19 Octobre 1944, il a été décidé que l'étalon international de Pénicilline serait constitué par un sel sodique pur et cristallisé de Pénicilline G et que l'unité internationale correspondrait à 0,6 microgramme de cette préparation. Ses propriétés et sa préparation furent soigneusement étudiées.

Il fut également décidé lors de cette conférence d'établir un étalon international de travail qui serait constitué par un sel calcique de Pénicilline exactement titré en fonction de l'étalon international. L'échantillon choisi titre 1 unité pour 2,7 microgrammes de produit.

L'un et l'autre de ces étalons doivent être conservés en petits tubes scellés, rigoureusement secs et en présence d'azote, à une température de - 2° à + 4° C.

L'étalon international de travail doit servir à titrer les étalons de travail secondaires de chaque laboratoire.

Depuis que l'on prépare normalement de la Pénicilline G cristallisée, l'étalon de travail à 1 unité pour 2,7 microgrammes n'est plus utilisé.

Le standard actuel est constitué par un sel de sodium de Pénicilline G cristallisée titrant 1667 unités au mg.

Les indications concernant la fréquence nécessaire du

renouvellement des solutions étalons et la préparation de cette solution sont extrêmement rares. Nous n'avons trouvé que D. H. HEILMAN et W.E. HERREL (89) qui aient signalé que les solutions standards pouvaient être conservées plusieurs mois en petits tubes maintenus dans la neige carbonique, à condition de ne pas les soumettre à des réchauffages répétés.

Nous exposerons plus loin en détail la question des solutions standards avec les conclusions pratiques que nous avons tirées des considérations des divers auteurs sur la stabilité des solutions de Pénicilline.

Quelle que soit la méthode de titrage utilisée, les divers participants à la Conférence de standardisation de la Pénicilline ont fait des solutions standards en tampon phosphaté stérile à 1 pour 100 environ et de pH 5 à 7 suivant les expérimentateurs.

7°) PRECISION DE LA METHODE D'OXFORD.-

La méthode de titrage de la Pénicilline par dilutions est donnée comme méthode de choix par H.W. FLOREY et M.A. JENNINGS (52) qui l'emploient pour les titrages fins comme des vérifications d'activité de standards.

W.H. SCHMIDT et A.J. MOYER (192) lui attribuent une précision à 10 à 15 pour 100 près, tandis que comparativement la méthode de HEATLEY leur donnerait une erreur de 15 à 20 pour 100.

P. BONET MAURY (15) étudiant les diverses causes d'erreurs de cette méthode du point de vue physique, biologique et mathématique conclut à des résultats précis à moins de 11 pour 100 près.

Pourtant J. LESSIAU (127) dans une étude comparable à la précédente, a trouvé des écarts pouvant atteindre 100 pour 100 selon la gamme de dilution utilisée, et attire l'attention sur le fait que l'opérateur voit mal le tube limite avec des gammes serrées. Des écarts aussi importants ne nous semblent guère admissibles quand les conditions de travail sont satisfaisantes.

Si l'on examine attentivement les résultats donnés à la Conférence Internationale de Standardisation de la Pénicilline et que l'on calcule les pourcentages extrêmes d'erreur, on n'arrive jamais à de telles valeurs. Dans le tableau n° 2, nous rapportons quelques-uns de ces résultats pour lesquels nous avons calculé les erreurs extrêmes.

Ces quelques chiffres officiels nous assuraient de la précision très satisfaisante d'une méthode de titrage dont l'étude systématique approfondie n'avait jamais été entreprise.

Aussi étions-nous encouragée à lui apporter notre contribution, et nous efforcer d'en tirer un protocole expérimental simple et pratique.

TABLEAU N° 2

Quelques résultats de titrage par dilution à la Conférence Internationale de Standardisation de la Pénicilline

Auteur	Échantillon	Nombre de titrages	Moyenne	Titre extrême observé inférieur	Écart pour 100 sur la moyenne	Titre extrême observé supérieur	Écart pour 100 sur la moyenne
TREVAN	X.	6	595	570	-4,2	648	+ 0,8
	X.	6	609,6	603	-1	658	+ 7,8
	PBS	6	155,4	152	-2,1	179	+ 15
		6	155,3	151	-2,7	172	+ 10
	FDA référence	6	347,2	330	-4,9	364	+ 4,8
		6	347,2	342	-0,6	373	+ 8,3
	FDA maître-étalon	6	1556	1440	-7,6	1640	+ 5,4
		6	1564	1520	-2,8	1670	+ 6,7
WHITE	T.R.C.	16	71,7	71	-0,9	77	+ 7,3
	P.B.S.	11	156,8	151	-3,6	162	+ 3,3
	X.	6	588	562	-4,4	627	+ 6,6
	FDA référence	10	348	340	-2,2	359	+ 3,1
	FDA maître-étalon	10	1466	1400	-4,5	1620	+ 10

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

Nos recherches ont principalement porté sur la mise au point d'une technique simple et facilement reproductible de la méthode de dosage par dilution en prenant comme test l'inhibition de la croissance d'un Staphylocoque.

En nous documentant sur l'ensemble de la question des antibiotiques et en étudiant les résultats obtenus jusqu'à ce jour, nous avons été frappée par la complexité et l'étendue de ce domaine nouvellement exploité. Notre attention s'est trouvée spécialement retenue par le fait signalé à plusieurs reprises, en particulier par M.M. JANOT (105) et C. LEVADITI (128) qu'à côté de la Pénicilline il peut exister dans les liqueurs de culture du Penicillium notatum Westling, d'autres antibiotiques.

On sait encore que ces substances peuvent même exister seules à l'exclusion de toute Pénicilline, dans la culture d'un Penicillium générateur de Pénicilline habituellement, comme l'a remarqué C.A. GREEN. Ces antibiotiques associés ont été décrits sous différents noms. Ce sont : La Notatine de C.E. COULTHARD et ses collaborateurs (31), la Pénatine de W. KOCHOLATY (120) (121) (122), la Pénicilline B de E.C. ROBERTS, J.R. VAN BRUGGEN et leurs collaborateurs (184) (20), et enfin la Corylophylline, isolée de plusieurs Penicillia par H. PENAU, C. LEVADITI et leurs collaborateurs et étudiés par eux à la fois sur le plan biologique et chimiothérapique (131) (132) et (156), et sur le plan chimique (154) (155).

J.H. BIRKINSHAW et H. RAISTRICK (14) ont reconnu que Pénatine, Notatine et Pénicilline B ne devaient être qu'une même substance. Il semble qu'on doive leur assimiler également la Corylophylline qui répond aux mêmes caractères culturaux et physico-chimiques, s'extrait de la même façon et agit dans des conditions identiques. Toutes ces substances doivent d'ailleurs être rapprochées de la glucooxydase de D. MULLER retirée d'autres moisissures banales.

Mais ces divers auteurs ne paraissent pas avoir tiré de conclusions pratiques de leurs découvertes en ce qui concerne les titrages et notre attention s'est trouvée particulièrement attirée par l'importance que pouvait avoir l'existence simultanée de ces substances antibactériennes et de la Pénicilline dans un jus de culture, et du trouble qu'elles devaient inévitablement apporter dans le dosage de cette dernière. Ces substances répondent, en effet, à des conditions d'extraction et d'action différentes de celles de la Pénicilline.

Lorsqu'on a à titrer un jus de culture, il paraît donc important de pouvoir connaître son activité en Pénicilline vraie seule, puisque c'est celle-ci que l'on utilisera, et cela particulièrement dans les travaux de recherches de nouvelles espèces productrices de Pénicilline.

Seul F. KAVANAGH (110) a eu l'attention attirée sur

ce fait et conseille de détruire la Pénicilline existant dans le milieu en expérience par la Clarase ou la Pénicillinase et de titrer la liqueur avant et après traitement.

Nous avons donc été ainsi amenée à chercher à isoler la Pénicilline en vue de son dosage exact.

On pouvait envisager cet isolement de la Pénicilline de plusieurs façons : soit extraire du jus de culture à titrer les autres antimicrobiens pouvant y exister, soit au contraire extraire la Pénicilline, soit enfin essayer de détruire les antibiotiques éventuels autres que la Pénicilline sans toucher à celle-ci.

Nous avons entrepris des recherches dans ces trois directions. Mais quelle que soit la direction suivie il fallait arriver à une technique rapide.

I - ELIMINATION DES ANTIBIOTIQUES ASSOCIES A LA PENICILLINE

A - PAR EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES AUTRES QUE LA PENICILLINE.

Nous basant sur les propriétés de ces substances associées, nous avons tout d'abord essayé de les éliminer du milieu par extraction.

C'est ainsi que nous avons traité les jus de culture (X) par l'acide benzoïque, qui adsorbe la Corylophylline, selon la technique de H. PEÑAU et G. HAGEMANN (154) indiquée également par E.C. ROBERTS et ses collaborateurs (184).

Technique de l'adsorption benzoïque :

On prend 10 cm3 de jus de culture stérile à titrer, refroidi à 0°, que l'on met en contact avec 1 g. d'acide benzoïque pur tamisé au tamis n° 100. On laisse en contact 1/2 heure à 0° et on centrifuge dans les bols stérilisés d'une centrifugeuse à refroidissement, pour éviter toute élévation de température pouvant détruire de la Pénicilline au pH assez bas où se trouve le liquide; on décante le jus surnageant qui ne contient plus que de la Pénicilline vraie que l'on peut alors titrer; on peut ensuite comme contre épreuve faire l'extraction de la Corylophylline à partir de l'acide benzoïque qui l'a fixée; on reprend le culot de centrifugation par 15 cm3 d'éther sec (éther conservé sur sodium); l'acide benzoïque est ainsi dissous, et on ajoute 5 cm3 d'eau stérile, on centrifuge, on élimine le culot et on décante en ampoule la phase aqueuse où est passée la Corylophylline. On lave à nouveau l'éther à l'eau stérile de façon à obtenir 10 cm3 de solution aqueuse (volume de l'échantillon de départ). On fait sur cette nouvelle solution un titrage d'activité qui correspond donc aux antibiotiques autres que la Pénicilline.

(X) Tous les jus de culture dont nous avons disposé au cours de ces recherches étaient produits par des cultures en surface.

Nous avons travaillé sur des cultures de Penicillium notatum Westling, dont on suivait l'activité quotidiennement; le pH était donc différent chaque jour, et nous avons obtenu les résultats du tableau n° 3.

Les résultats obtenus furent donc inconstants et non concluants; la Corylophylline semble apparaître ou disparaître irrégulièrement, l'activité est parfois supérieure après traitement à l'acide benzoïque (ce qui nous a fait émettre l'hypothèse de l'existence de précurseur de la Pénicilline que le traitement chimique libérerait).

Considérant ces irrégularités et les pH différents chaque jour du jus de culture que nous utilisions, nous avons été amenée à nous demander si la Pénicilline, bien que non extractible par l'acide benzoïque en totalité, ne serait pas fixée en partie par l'acide benzoïque dans les conditions expérimentales où nous opérions, c'est-à-dire si des solutions de Pénicilline pure à différents pH, traitées suivant la technique précédemment indiquée ne perdent pas une partie de leur activité.

Pour vérifier cette hypothèse on a utilisé un pénicillinate de sodium mis en solution dans de l'eau distillée d'une part et dans des solutions tampons à différents pH d'autre part.

Les solutions tampons employées sont les tampons de SORENSEN aux phosphates obtenus en mélangeant des quantités variées de solution M/15 de phosphate monopotassique et de phosphate disodique.

Chacune des solutions obtenues est titrée et traitée à l'acide benzoïque selon la technique de H. PENAU et G. HAGEMANN, puis titrée à nouveau après ce traitement.

L'ensemble de nos résultats se trouve consigné dans le tableau n° 4.

De l'examen de ce tableau, il ressort donc que la Pénicilline est fixée au moins partiellement par l'acide benzoïque, la quantité fixée est d'autant plus importante que le pH est plus bas. Elle diminue lorsque le pH se rapproche de la neutralité et est nulle à partir de pH 7,0. Incidemment, ce tableau nous montre aussi que c'est de pH 6,5 à 7,0 que la Pénicilline paraît avoir son maximum d'activité.

Les courbes de la figure n° 1 en rendent compte clairement.

Ainsi se trouvent expliquées les différences que nous avions observées lors de nos essais de traitement des jus de culture à l'acide benzoïque. Si l'on se reporte à ce tableau, on voit qu'à partir de pH 7,0, l'acide benzoïque n'enlève généralement plus aucune activité à la liqueur, ce qui est en accord avec les résultats précédents, mais la Corylophylline ne se produisant qu'en milieu acide, c'est justement pour les pH inférieurs à 7 qu'il est le plus utile de pouvoir isoler la Pénicilline des autres antimicrobiens éventuellement existants. Nous avons donc abandonné ce procédé d'isolement de la Pénicilline pour en rechercher un plus satisfaisant.

TABLEAU N° 3

- Séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques -

A) Extraction benzoïque sur des liqueurs de culture

Référence de l'échantillon	pH	Activité en U par cm³ par titrage direct	Activité en U par cm³ après acide benzoïque
B 26 I	6,5 7,1 7,2	5 30 15	5 30 15
B 26 II	7,1 7,2	70 110	10 10
B 27 a	5,5 6,1	30 5	5 10
B 27 b	5,9	30	5
B 44 3	6,8 6,7 6,4 6,1	50 40 40 40	30 50 50 40
B 44 4	6,8 6,7 6,25 6,25	20 50 10 70	20 30 30 30
B 44 5	6,3 6,2	1 30	30 30
B 44 6	6,6 6,5 6,2 6,1	50 110 110 80	30 50 70 50
B 44 7	6,4 6,3 6,3 7,4	90 0 110 70	50 70 50 50
B 44 8	6,3 6,1 6,1	30 30 40	30 0 10
B 44 9	6,2 6,2	30 40	30 30

Figure 1

Adsorption benzoïque de solutions de pénicilline à différents pH.

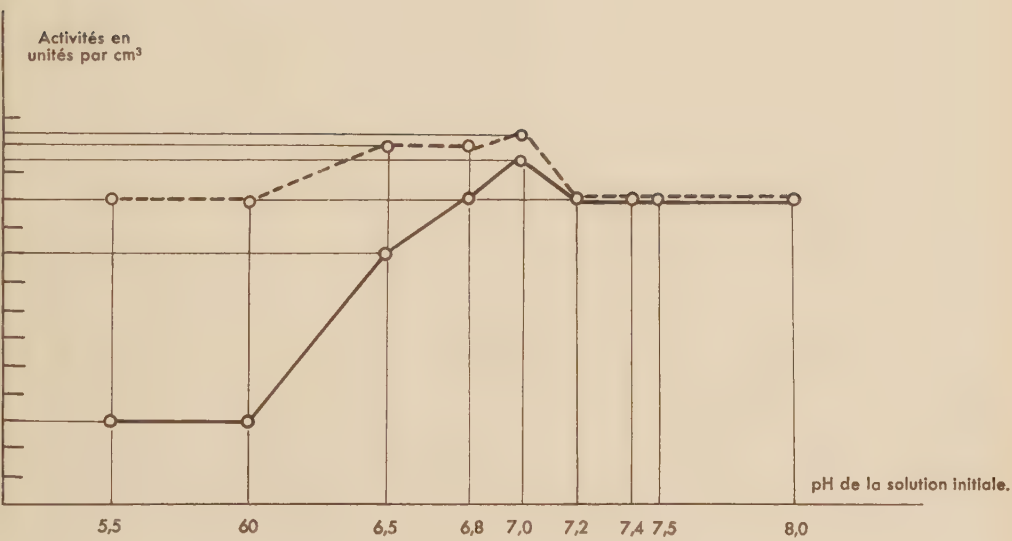


TABLEAU N° 4

- Séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques -

A) Adsorption benzoïque sur des solutions de Pénicilline tamponnées à différents pH.

pH initial de la solution	pH après acide benzoïque	Activité avant acide benzoïque		Activité après acide benzoïque	
5,5	4,0	11 11 11	11	3 3 3	3
6,0	4,1	11 11 11	11	3 3 3	3
6,5	4,3	13 13 13	13	9 9 9	9
6,8	4,5	13 13,5 12,5	13	11 11 11	11
7,0	4,7	14 13 13	13,8	13 12 13	12,6
7,2	4,6	11 11 11	11	11 11 11	11
7,4	4,7	11 11 11	11	11 11 11	11
7,5	4,7	11 11 11	11	11 11 11	11
8,0	4,8	11 11 11	11	11 11 11	11
eau distillée 6,1	3,4	11 11 11	11	1 1 1	1

B - PAR EXTRACTION DE LA PENICILLINE.-

La séparation des antibiotiques existant avec la Pénicilline ne s'étant pas montrée satisfaisante, nous avons alors essayé l'opération inverse, c'est-à-dire l'extraction de la Pénicilline elle-même.

Nous avons pratiqué cette extraction d'après les indications données par K. MEYER et ses collaborateurs (140), selon une technique mise au point par H. PENAU et G. HAGEMANN.

On prélève à la pipette 10 cm3 exactement de liqueur filtrée que l'on verse dans un petit Erlenmeyer de 30 cm3. On refroidit dans la glace pilée pendant 5 minutes en agitant. Lorsque la température de la liqueur est de + 2° (noter au thermomètre), on ajoute à la burette de l'acide phosphorique pur CODEX dilué à 1/5, jusqu'à ce que la liqueur soit à pH 3 (au méthylorange et au bromo phénol bleu); on transvase aussitôt dans une ampoule à décanter de 30 cm3 refroidie en glacière, et on ajoute 5 cm3 de chloroforme anesthésique. On agite vigoureusement à 3 reprises, on laisse reposer 5 minutes en glacière à 0° et on transvase le mélange, qui est fortement émulsionné, dans un tube de centrifugeuse de 30 cm3 refroidi. On centrifuge à grande vitesse deux minutes, dans une centrifugeuse à refroidissement si possible pour éviter toute élévation de température. Si l'on ne dispose pas de centrifugeuse à refroidissement, il est bon de remplir les bols de la centrifugeuse non utilisés avec de la glace pilée, qui refroidira l'atmosphère. Après centrifugation, on transvase aussitôt dans l'ampoule à décanter à l'aide d'un petit entonnoir de 10 cm3. On décante la phase inférieure chloroformique et on conserve celle-ci en glacière à 0° en attendant les suivantes.

On fait sur la phase aqueuse deux nouvelles extractions identiques, mais avec chaque fois 4 cm3 de chloroforme.

On réunit ensuite les 3 extraits chloroformiques refroidis à 0°, on filtre sur coton dans une ampoule à décanter de 30 cm3, on rince le coton avec 2 cm3 de chloroforme et on agite avec 5 cm3 de solution tampon stérile à pH 7 (aux phosphates disodique et monopotassique). On décante la phase aqueuse et on agite la solution chloroformique avec 5 cm3 d'eau stérile.

On réunit les deux solutions aqueuses dans une fiole jaugée de 10 cm3, on ajuste à 10 cm3 exactement (volume de la prise d'essai), avec de l'eau stérile, après avoir contrôlé le pH qui doit être 6,8 à 7.

Cette solution contient la Pénicilline de la liqueur initiale débarrassée de la Corylophylline et des substances inhibitrices autres.

Nous avons répété un très grand nombre de fois cette extraction sur des jus de culture de Penicillium à différents stades de leur évolution comme dans le cas précédent.

Nous donnons dans le tableau n° 5 quelques-uns de nos premiers résultats, certains ayant été accompagnés d'une extraction de Corylophylline.

TABLEAU N° 5

Séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques

B - Extraction de la Pénicilline sur liqueurs de culture

Référence de l'échantillon	pH	Titre brut en U par cm³	Pénicilline extraite en U par cm³	Corylophylline extraite en U par cm³
B 51 - 1	6,96	6	3	-
	7,96	10	5	0
	8,35	30	9	0
	8,62	30	10	-
B 51 - 2	6,96	8	2	-
	7,75	10	6	0
	8,36	30	16	0
B 53	6,6	2	1	-
	8,24	20	10	0
	8,3	19	6	0
	8,62	25	8	0
	8,9	17	6	0
	9	16	4	-
B 28 - 2	6,5	5	2	
	6,8	8	3	
	7.	6	5	
	7,2	10	5	
B 49	6.2	1	1	
	7,7	5	5	
	7,9	15	9	
B 50	7,1	12	2	
	8,1	20	12	
	8,6	22	2	
	8,8	23	19	
	8,9	28	27	

Comme le montre l'examen de ce tableau, on ne retrouve généralement pas, par extraction, la même activité que dans le dosage de la liqueur brute, même en l'absence totale de Corylophylline.

Pourtant nous avions contrôlé la valeur de cette technique en pratiquant les extractions sur des solutions de Pénicilline pure à différents pH, avec un rendement se situant aux environs de 95 pour 100 généralement, comme nous le voyons dans le tableau n° 6.

TABLEAU N° 6

Séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques

B - Extraction de la Pénicilline sur des solutions tamponnées à différents pH

pH initial de la solution	Activité par titrage direct en U/cm³		Activité par extraction en U/cm³		Différence pour 100 sur titrage direct
5,96	12 12 12	12	12 11 11,5	11,5	- 4
6,2	10,5 10 10,5	10,3	11 10,5 11	10,8	+ 4,8
6,8	11 11 11	11	10,5 11 11,5	11	0
7,32	10,5 11 10	10,5	9,5 10 10,5	10	- 4,7
8,0	12 13 11	12	12 12 12	12	0
8,4	10 10 10	10	10 11 9	10	0
eau distillée 6,1	13 10 10	11	11,5 12 11	11,5	+ 4,5

Ayant à cette période de notre travail, disposé de souches américaines de Penicillium notatum Westling éprouvées et ne produisant pas de Corylophylline, mais exclusivement de la Pénicilline, nous avons continué à pratiquer l'extraction rapide de la Pénicilline et nos résultats ne furent pas plus encourageants : une partie de la Pénicilline (nous étions certaine qu'il ne s'agissait pas ici d'une autre substance) échappait à l'extraction. Cette fraction était variable au cours d'une même culture et n'était pas prévisible d'une culture à la suivante, comme les chiffres suivants pris parmi nos expériences le prouvent (tableau N° 7).

Nous étions arrêtée devant ces résultats quand une

TABLEAU N° 7

- Séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques -

B) Extraction de la Pénicilline des liqueurs de culture de souches ne produisant que de la Pénicilline

Référence de l'échantillon	pH	Titre direct en U/cm³	Titre par extraction en U/cm³
B 62 H 6	7,8	25	30
	8,1	60	57
	8,4	29	30
	8,5	22	12
B 66	7,4	21	16
	7,4	44	16
	7,5	42	29
	7,	33	22
B 68	6,4	6	4
	7	14	2
	7,7	18	12
	7	21	8
	7,7	20	18,5
	7,7	24	18
	7,7	22	17
B 72	7,8	20	14
	8,3	32	24
	8,4	34	32
	8,25	45	49
	8,25	39	45
B 73	7,9	28	22
	7,4	36	28
	7,2	36	34
	7,4	44	26
	7,7	42	32
	7,9	54	34
B 79	7,8	13	13
	7,75	30	21
	7,9	28	24
	7,9	36	27
	8	32	32
	8,1	30	28
B 70	7,07	14	8
	7,9	25	24
	8	25	22
B 75	7,7	20	20
	7,75	19	18
	8	30	28
	8	34	30
B 80 _ 1	7,8	23	20
	7,8	32	25,5
	8,1	26	26
	8,1	40	32
	8,5	39	36
	8,8	28	25

publication de K.B. RAPER et D.I. FENNEL (179) nous a appris que la Pénicilline X qui se produit assez souvent dans les cultures en surface (jusqu'à 50 pour 100) avec la Pénicilline G, mais de façon irrégulière, est insoluble dans le chloroforme.

Nous avions donc là l'explication de la disparition apparente de Pénicilline au cours de l'extraction chloroformique.

Nous ne pouvions donc généraliser l'emploi de ce procédé de séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques éventuellement produits par certaines souches.

Néanmoins, nous tenons à faire remarquer qu'il peut avoir son utilité lorsqu'on désirera faire la recherche ou l'évaluation quantitative rapide de la Pénicilline X et de la Pénicilline G séparément au cours des investigations sur les milieux de culture par exemple, ainsi qu'au cours des recherches chimiques sur la purification et la sélection des diverses Pénicillines existantes, ainsi que pour les contrôles d'activité de comprimés ou pommades que l'on ne peut titrer qu'après extraction.

C - PAR DESTRUCTION DANS LE MILIEU MEME DES ANTIBIOTIQUES EVENTUELS.-

Il fallait donc nous diriger vers la 3ème possibilité, les deux premières ne nous ayant donné que des résultats imparfaits.

Comme nous l'avons déjà remarqué Pénatine, Notatine, Corylophylline, ne sont en réalité qu'une seule et même substance, identique elle-même à la glucoaérodéhydrogénase de MULLER. L'antibiotique coexistant éventuellement avec la Pénicilline est donc une diastase et comme telle doit être détruite rapidement par la chaleur. Ayant fait cette remarque, nous avons pensé qu'il devait être possible d'éliminer cette Corylophylline par chauffage du jus de culture étudié.

Il fallait simplement être sûre que dans ces conditions la Pénicilline n'était pas au moins partiellement détruite.

Comme dans le cas précédent, nous avons donc vérifié au préalable sur des solutions de Pénicilline, tamponnées à différents pH, la stabilité de celles-ci à la chaleur. Un sel de sodium de Pénicilline (échantillon 76 B 5) titrant environ 450 U/mg a été mis en solution dans diverses solutions tampon et dans l'eau distillée, de façon à obtenir des solutions de même concentration, soit 15 Unités/cm3.

Chaque solution obtenue a été partagée en deux :

Une moitié a été titrée directement, et l'autre chauffée au bain-marie pendant 2 minutes à 70° et refroidie brusquement ensuite dans l'eau glacée, puis titrée. Les résultats obtenus furent les suivants (tableau n° 8).

Leur examen montre que bien que légèrement inférieurs

TABLEAU N° 8

Séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques

C - Effet du chauffage sur des solutions de Pénicilline à différents pH

pH de la solution	Activité par titrage direct en U/cm³		Activité après chauffage en U/cm³		Différence pour 100 sur titrage direct.
5,86	16 16 15,5	15,8	15 15 15,5	15,1	- 4,4
6,2	15 14,5 14	14,5	13,5 13,5 13,5	13,5	- 6,8
6,8	15 15,5 14,5	15	14 15 16	15	0
7,32	14,5 14,5 14,5	14,5	14 13,5 14,5	14	- 3,4
8,0	17 16 15	16	15 14,5 14	14,5	- 9,3
8,4	14 15 15	14,6	14,5 13 13	13,5	- 7,5
eau distillée 6,1	14 14 14	14	13 13,5 12,5	13	- 7,1

après chauffage, les titres obtenus ainsi diffèrent des titres des liqueurs non chauffées de moins de 10 pour 100.

Une deuxième série d'expériences conduites de la même façon avec une autre solution de Pénicilline a confirmé ces résultats, comme le prouve le tableau n° 8 bis.

Il faut noter cependant une diminution de stabilité à la chaleur des solutions de Pénicilline aux pH très alcalins, nettement visible dans les deux groupes d'expériences.

Ces deux groupes d'expériences peuvent être résumés sur un même graphique, qui met clairement en relief la stabilité de la Pénicilline à un chauffage de 70° pendant 2 minutes (figure n° 2).

Pour compléter ces recherches et avant d'appliquer cette technique à des jus de culture, nous avons essayé l'effet du chauffage dans les mêmes conditions sur des solutions de Corylophilline pure dont nous avons pu disposer. Dans toutes

chauffage de solution de pénicilline à différents pH.

Figure 2

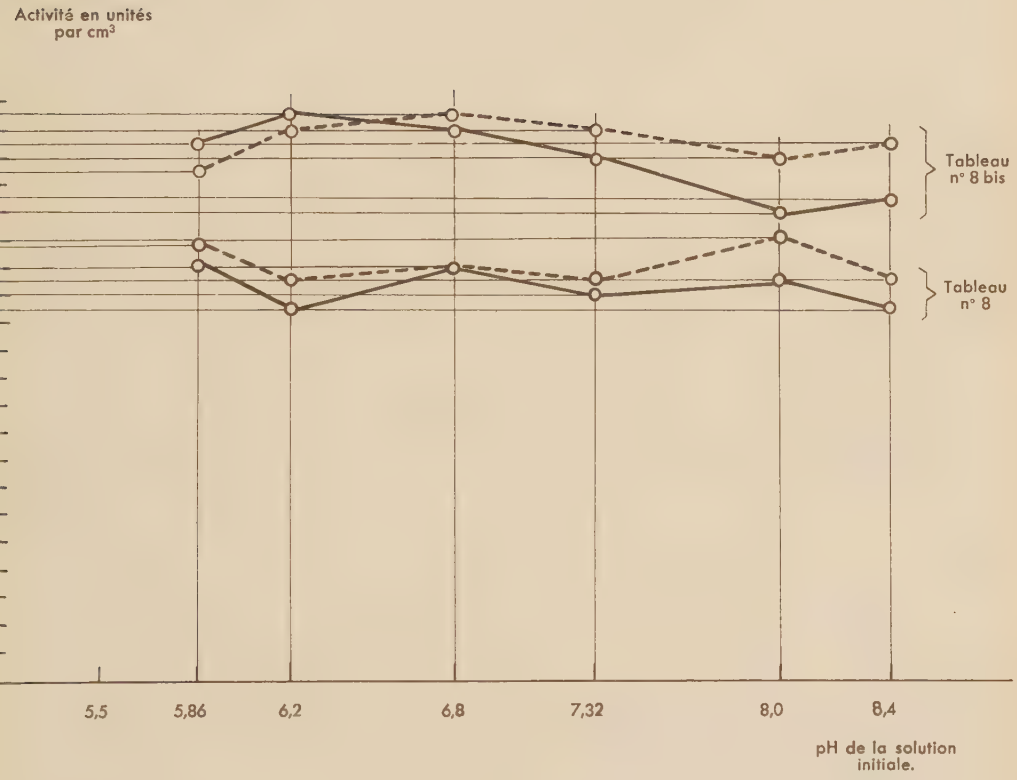


TABLEAU N° 8 bis

Séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques

C - Effet du chauffage sur des solutions de Pénicilline à divers pH

pH	Activité par titrage direct en U/cm³	Activité après chauffage en U/cm³	Différence pour 100 sur le titrage direct
eau distillée	19,5	19	- 2,5
5,86	18,5	19,5	+ 5,4
6,20	20	20,5	+ 2,05
6,8	20,5	20	- 2,05
7,32	20	19	- 5
8,00	19	17	- 10,5
8,40	19,5	17,5	- 10,2

les liqueurs ainsi traitées l'activité antibactérienne avait complètement disparu après chauffage.

Nous pouvions donc appliquer cette méthode de séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques à des jus de culture. Pourtant, nous ne pouvions garantir à priori que cette technique nous donnerait satisfaction, malgré notre expérimentation préalable sur l'effet du chauffage sur la Pénicilline et la Corylophylline. En effet, la Pénicilline sur laquelle nous avions fait les essais était une Pénicilline assez pure mise en solution dans des liqueurs bien définies (solutions tampons aux phosphates purs). On ne pouvait savoir si dans son milieu de production, milieu salin additionné le plus souvent de produits naturels tels que des extraits de céréales ou de levure, ou encore d'acides aminés purs, et contenant outre les constituants initiaux tous les produits de métabolisme du Penicillium, on ne pouvait donc savoir si la Pénicilline se comporterait de la même façon dans ce milieu complexe que dans une simple solution phosphatée. L'expérimentation qui nous apporta les résultats du tableau N° 9 pouvait seule justifier ou condamner cette technique.

Les liqueurs sur lesquelles nous avons travaillé ont été obtenues par la culture de souches américaines de Penicillium chrysogenum éprouvées ne produisant pas de Corylophylline.

TABLEAU N° 9

Séparation de la Pénicilline des autres antibiotiques

C - Chauffage de liqueurs de culture

N° de référence	pH	Titrage direct en U/cm³	Titre après chauffage en U/cm³
B 84	7,3	66	65
B 86	7,2	60	60
B 87	7,7	63	61
B 88	8,3	56	58
B 89	8,6	40	39
B 92	8,3	49	52
B 96	8,1	48	48

Ces résultats nous prouvaient donc que le chauffage à 70° pendant deux minutes suivi de refroidissement brusque laissait intacte la Pénicilline dans son milieu de production. Comme nous avions déjà vu que la Corylophylline était effectivement détruite dans ces mêmes conditions, nous avions alors toute garantie sur l'efficacité et la sécurité de cette technique d'isolement de la Pénicilline des autres antibiotiques éventuellement associés.

II - ESSAI DE STABILISATION DES JUS DE CULTURE EN VUE DE LEUR CONSERVATION

Le chauffage à 70° s'étant montré efficace pour la destruction de la diastase Corylophylline, nous avons pensé qu'il pourrait l'être également sur les Pénicillinases, diastases destructrices de la Pénicilline, produites par de nombreuses bactéries banales et en particulier par le B. subtilis, et être d'une grande aide dans la conservation d'une liqueur de culture. En effet, si les cultures de Penicillium sont évidemment aseptiques au cours de leur évolution, la récolte des bouillons dans l'industrie ne peut être faite stérilement. Ceux-ci vont donc au cours des manipulations subies se souiller des bactéries de la flore aérienne banale, entre autres des bactéries, du groupe subtilis, qui vont par leur Pénicillinase détruire une fraction plus ou moins importante de la Pénicilline selon la durée de leur action. Il est donc à conseiller, si une liqueur de culture ne peut être traitée aussitôt après sa récolte, de lui faire subir ce chauffage. Mais il sera indispensable que la température de 70° soit atteinte très rapidement et la liqueur refroidie non moins rapidement, pour ne pas risquer d'attaquer la Pénicilline par un chauffage prolon-

gé. Cette opération pourra être faite facilement dans un appareil du genre des appareils utilisés à la pasteurisation du lait.

Pour compléter ce traitement et assurer de plus la stérilité de la liqueur, on l'additionnera de formol (solution officinale à 40 pour 100) qui empêchera la pullulation des germes à la dose de 1 pour 1000(on sait que le formol est sans action sur la Pénicilline, comme l'ont montré G. RAMON et R. RICHOU (172). Ces diverses opérations seront faites sur la liqueur dont on aura ramené le pH vers 6,8 - 7,0 auquel la Pénicilline présente un maximum de stabilité.

L'expérience montre que les jus ainsi traités se conservent très bien et très longtemps à 4° et ne voient leur activité diminuer que très lentement.

En vue de rechercher le meilleur mode de stabilisation (température et temps de chauffage - addition de formol - filtration sur filtre SEITZ stérilisant), nous avons comparé entre eux dans le temps des jus de culture diversement traités. Nous avons essayé de remplacer le chauffage de deux minutes à 70° précédemment fait sur de très petites quantités (2 ou 3 cm3, quantité suffisante pour le dosage) par une tyndallisation à une température plus basse, mais prolongée plus longtemps, principalement parce que le volume mis en œuvre était ici plus important (le jus formolé était réparti en ampoules de 5 cm3 stériles que l'on scellait et chauffait par immersion dans un bain marie à la température choisie). Ensuite nous avons remplacé les 3 chauffages de la tyndallisation par un seul chauffage. Ultérieurement, nous avons, au contraire, augmenté la température de chauffage et diminué sa durée.

En résumé, nous avons étudié la conservation à+4°C des liqueurs ainsi traitées :

TABLEAU N° 10.-

- jus formolé à 1 pour 1000chauffé (tyndallisation 3 fois 1/2 heure),

- le même jus formolé à 1 pour 1000,non chauffé,

- le même jus non formolé stérilisé par filtration sur filtre SEITZ.-

TABLEAU N° 11.-

- jus formolé à 1 pour 1000,non chauffé,

- le même jus formolé 1 pour 1000,chauffé à 80°, 10 minutes,

- le même jus formolé à 1 pour 1000,chauffé à 55° 1/2 heure.

Les membranes stérilisantes SEITZ que nous avons employées sont des membranes "E.K. SERUM" que nous avons lavées préalablement à l'aide d'une solution tiède saturée d'acide benzoïque, puis rincées à l'eau distillée jusqu'à disparition totale de l'acidité (neutralité au B.T.B.).

Après ce traitement, les filtres montés sur une fiole à vide étaient stérilisés à l'autoclave à 120° pendant 1/2 heure.

Nous avons préalablement vérifié que, dans ces conditions, les membranes stérilisantes ne fixaient pas de Pénicilline.

TABLEAU N° 10

Stabilisation des jus de culture

Durée de conservation à + 4°C	Jus formolé à 1 pour 1000 tyndallisé 3 fois ½ H à 55°	Jus formolé à 1 pour 1000 non chauffé	Jus non formolé filtré sur filtre SEITZ
1° jour	66 U/cm³	66 U/cm³	66 U/cm³
1° semaine	–	65	65
2° –	60	–	–
3° –	59	57	32
4° –	58	54	< 30
5° –	58	45	12
7° –	59	43	–
11° –	> 40	33	–

TABLEAU N° 11

Stabilisation des jus de culture

Durée de conservation à+4°C	Jus formolé à 1 p. 1000 chauffé ½ H. à 55°	Jus formolé à 1 p.1000 chauffé 10 m. à 80°	Jus formolé à 1 p.1000 non chauffé
1° jour	60 U/cm³	60 U/cm³	60 U/cm³
1° semaine	55	58	58
2° –	55	58	47
3° –	58	58	37
4° –	60	52	–
6° –	60	–	28
8° –	55	55	–
10° –	56	56	29
13° –	48	48	27
18° –	32	42	8

L'examen de ces deux tableaux nous montre d'abord que les jus simplement filtrés sur filtres SEITZ ne se conservent pas.

Ensuite, nous voyons que l'effet de la tyndallisation à 55°, du chauffage unique à cette même température, ou du chauffage plus court à 80°, sont équivalents puisque dans les trois cas, la baisse d'activité a été après deux mois de conservation comprise entre 8 et 10 pour 100 seulement. On pourra donc utiliser sans risque l'une de ces trois techniques pour stabiliser des liqueurs de culture .

Par contre, on voit que la seule addition du formol n'est pas suffisante à stabiliser les jus, si elle n'est pas suivie d'un chauffage.

H. VELU, H. PENAU, D. CHABANAS, et nous-même (217) avons déjà antérieurement signalé les bons résultats que nous avait donnés cette technique, indiquée à la même époque par G. RAMON, R. RICHOU et J. RAMON (173).

III - ETUDE DU DOSAGE DE LA PENICILLINE PAR DILUTION, EN UTILISANT LE STAPHYLOCOQUE COMME GERME D'ESSAI

A - PREPARATION DE LA REACTION.-

1°) MATERIEL.-

Une opération complète de titrage pourra se décomposer en 4 phases; à chacune d'elles correspond un matériel défini.

a) La précision de la méthode de dilution est fonction de la précision de la mesure des volumes qui entrent en jeu.

La première phase du titrage consiste dans la préparation des tubes de milieu de culture où se fait la réaction. La répartition du bouillon avant ou après sa stérilisation peut se faire soit à la pipette, soit à l'aide d'appareils jaugeurs automatiques, dans des tubes de capacité convenable.

Nous étudierons donc les divers modes possibles de répartition du bouillon, les tubes utilisés, leur stérilisation.

b) Cette phase est suivie de la préparation de la liqueur à titrer au taux convenable pour le titrage et de la distribution des dilutions dans les tubes de bouillon préparés préalablement.

On utilise le matériel habituel destiné aux mesures de précision : pipette à 1 cm³, 2 cm³, 10 cm³. Fioles jaugées de capacités diverses.

c) Vient en dernier lieu l'incubation à 37° qui peut être réalisée soit en étuve à air, soit au bain-marie.

Si cet appareillage ne présente pas de particularités en lui-même, son utilisation devra répondre à des règles strictes, et régulières, pour réaliser les conditions expérimentales optima que nous préciserons.

a) Matériel nécessaire à la préparation des tubes de bouillon.-

Comme nous le verrons ultérieurement, notre technique exige l'emploi de tubes contenant 4 cm3 de bouillon de titrage

Nous avons au début de notre expérimentation rempli ces tubes soit à la pipette graduée de 10 cm3, soit à la burette.

Ces deux procédés sont très longs. Nous avons alors amélioré le rendement en utilisant un rhéomètre. On peut remplir ainsi 250 tubes de 4 cm3 à l'heure avec une précision très satisfaisante. Après leur remplissage les tubes sont bouchés au coton cardé et stérilisés à l'autoclave.

Le passage à l'autoclave entraîne inévitablement un changement dans le volume de liquide contenu dans les tubes. Nous avons voulu connaître son importance et savoir s'il s'agissait d'une évaporation ou d'une condensation de la vapeur d'eau à travers le coton. Nous avons donc pesé un certain nombre de tubes de bouillon remplis au rhéomètre et bouchés au coton, sitôt après leur remplissage, puis après leur stérilisation pendant 20 minutes à 115°. Les tubes sont disposés pour leur stérilisation dans des paniers cylindriques de 15 cm de diamètre en fil de fer. Chaque panier contient environ 50 tubes.

Les mesures ont porté d'une part sur des tubes placés au centre du panier, d'autre part sur des tubes situés à la périphérie pour voir si ces derniers, plus exposés à l'action de la vapeur que les tubes du centre, subissaient de plus grandes variations de volume.

Nos pesées ont montré que tous les tubes subissaient une évaporation marquée, quelle que soit leur place dans le panier. Pour 4 cm3 de bouillon dont le poids est 4,0428 g., la perte a été (tableau n° 12).

Les tubes situés au centre subissent donc une évaporation plus importante que les tubes placés à la périphérie du panier; cela probablement parce que leur refroidissement après autoclavage se fait plus lentement.

Il faut signaler également une condensation massive (5 ou 10 cm3) difficilement explicable et assez rare, dans certains tubes.

Cette variation dans le volume des tubes de bouillon était donc une première cause d'erreur de la méthode de titrage. Nous avons voulu la supprimer ou tout au moins la réduire au minimum, et nous avons alors cherché à effectuer le remplissage des tubes de bouillon aseptiquement avec du bouillon préalablement stérilisé à l'autoclave. Le remplissage aseptique à la pipette étant évidemment beaucoup trop lent, nous l'avons remplacé par un remplissage automatique et nous nous sommes

TABLEAU N° 12

Evaporation du bouillon dans les tubes pendant la stérilisation

	Perte en mg. par tube	Moyenne
Tubes de la périphérie :		
N° 1	129,5	
2	110	
3	116,5	
4	120,5	
5	94,5	113,7 mg. soit 2,8 p. 100 du poids initial.
6	134	
7	83	
8	122	
Tubes du centre :		
N° 1	140	
2	166,5	
3	153,5	
4	142	
5	155,5	154,7 mg. soit 3,8 p. 100 du poids initial
6	148,5	
7	185,5	
8	146	

trouvée satisfaite des deux systèmes suivants que nous avons essayés :

1°) Remplissage à l'aide d'une seringue jaugeuse montée sur un robinet à trois voies connecté sur une allonge contenant le bouillon à répartir.

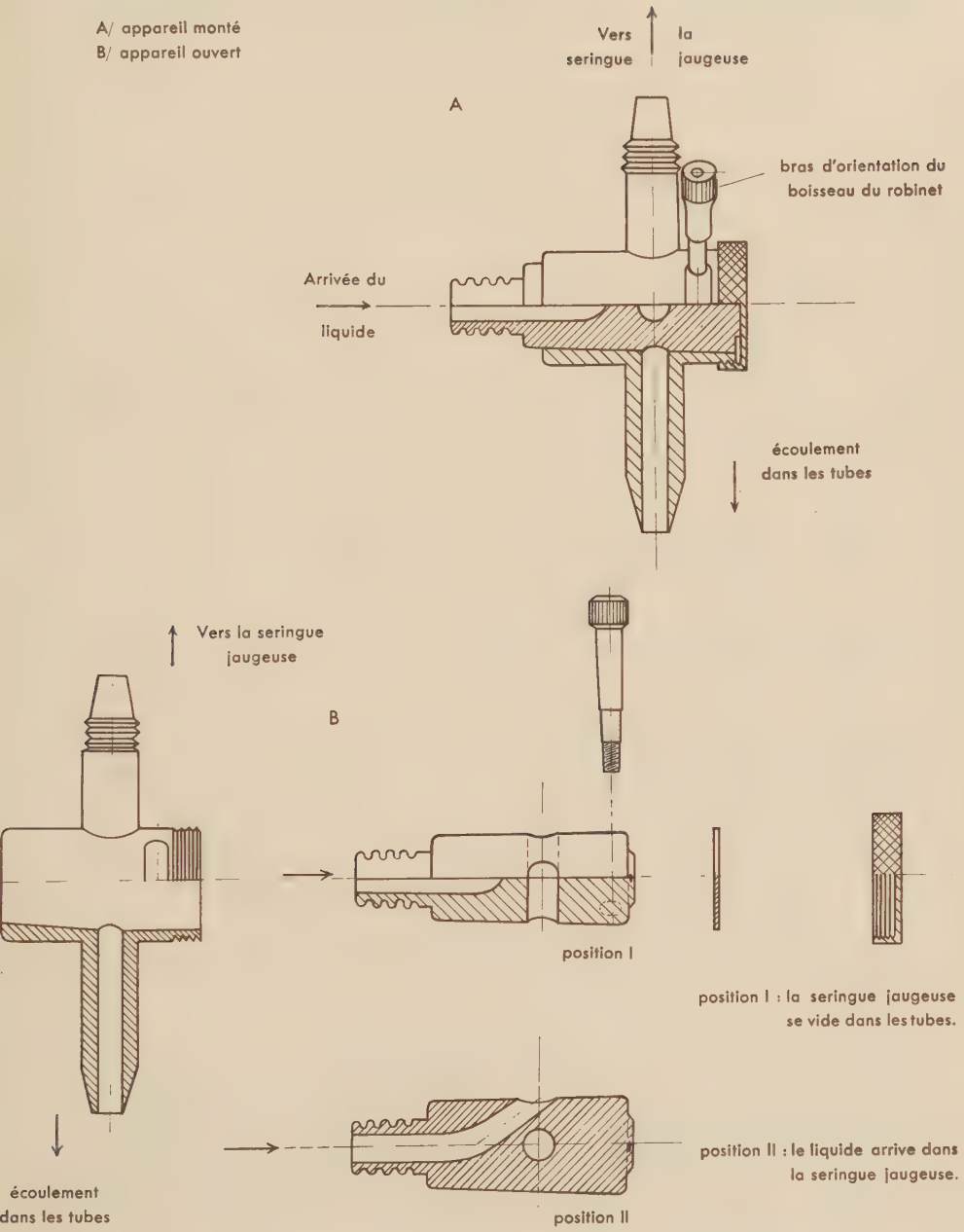
Un robinet à 3 voies (figure n° 3) en acier inoxydable est relié d'une part à une allonge contenant le bouillon, par un tuyau de caoutchouc fermé par une pince de MOHR, et d'autre part à une seringue jaugeuse dont le piston vient buter sur une cale située à hauteur convenable réglable selon le volume désiré. Le robinet utilisé est du modèle employé en Grande-Bretagne pour la répartition stérile des sérums. L'appareil est stérilisé à l'autoclave complètement monté, et l'allonge remplie de bouillon. Seul le piston de la seringue est stérilisé à part, la seringue étant bouchée au coton. Le tube d'écoulement du robinet est protégé par une cloche de verre que l'on enveloppe également de coton pour la stérilisation.

Au moment de l'emploi, on ouvre la pince de MOHR à la sortie de l'allonge mise en charge, on remplit le corps de la seringue jusqu'à effleurement au coton, que l'on enlève rapidement et en flambant pour le remplacer par le piston en prenant soin de ne pas laisser de bulles d'air. L'appareil est alors prêt à fonctionner.

Figure 3

Robinet métallique à 3 voies pour répartition stérile (0 — 1 cm)

A/ appareil monté
B/ appareil ouvert



Les tubes vides préalablement stérilisés au four Pasteur comme nous le verrons dans la suite, sont débouchés, flambés et rapidement introduits sous la cloche, pendant que l'on fait écouler le bouillon. La cloche elle-même est flambée tous les 10 tubes environ.

Cet appareil arrive aisément à débiter 300 tubes à l'heure.

2°) Remplissage à l'aide d'un appareil jaugeur en verre

Le second appareil que nous avons utilisé a été conçu entièrement en verre Pyrex et d'une seule pièce, sans aucun raccord de caoutchouc (figure n° 4).

Il se compose essentiellement d'une ampoule jaugeuse ajustée au volume exact désiré armée d'un trop plein; surmontant cette jauge se trouve le réservoir de bouillon, bouché émeri, relié par deux tubes fins d'une part à l'ampoule jaugeuse, d'autre part au trop plein. Un tube latéral garni de coton stérile sert à la rentrée de l'air.

Un robinet à 3 voies met en relation la jauge alternativement avec le réservoir et avec l'extérieur. La pipette d'écoulement est protégée par une cloche de verre.

L'appareil est stérilisé vide à l'autoclave et son remplissage fait stérilement à l'aide d'un simple ballon répartiteur à deux tubulures : l'une branchée sur l'air comprimé, l'autre plongeant dans le ballon.

Cet appareil nous a donné toute satisfaction : on peut arriver à avoir une ampoule jaugeuse de capacité finement ajustée, et les volumes des tubes ainsi préparés sont parfaitement exacts et réguliers.

On obtient régulièrement le volume de 4 cm3 à $\pm$ 0,1 cm3.

On peut préparer ainsi 350 tubes à l'heure.

Les inconvénients de cet appareil sont sa fragilité et l'impossibilité de faire varier le volume réparti.

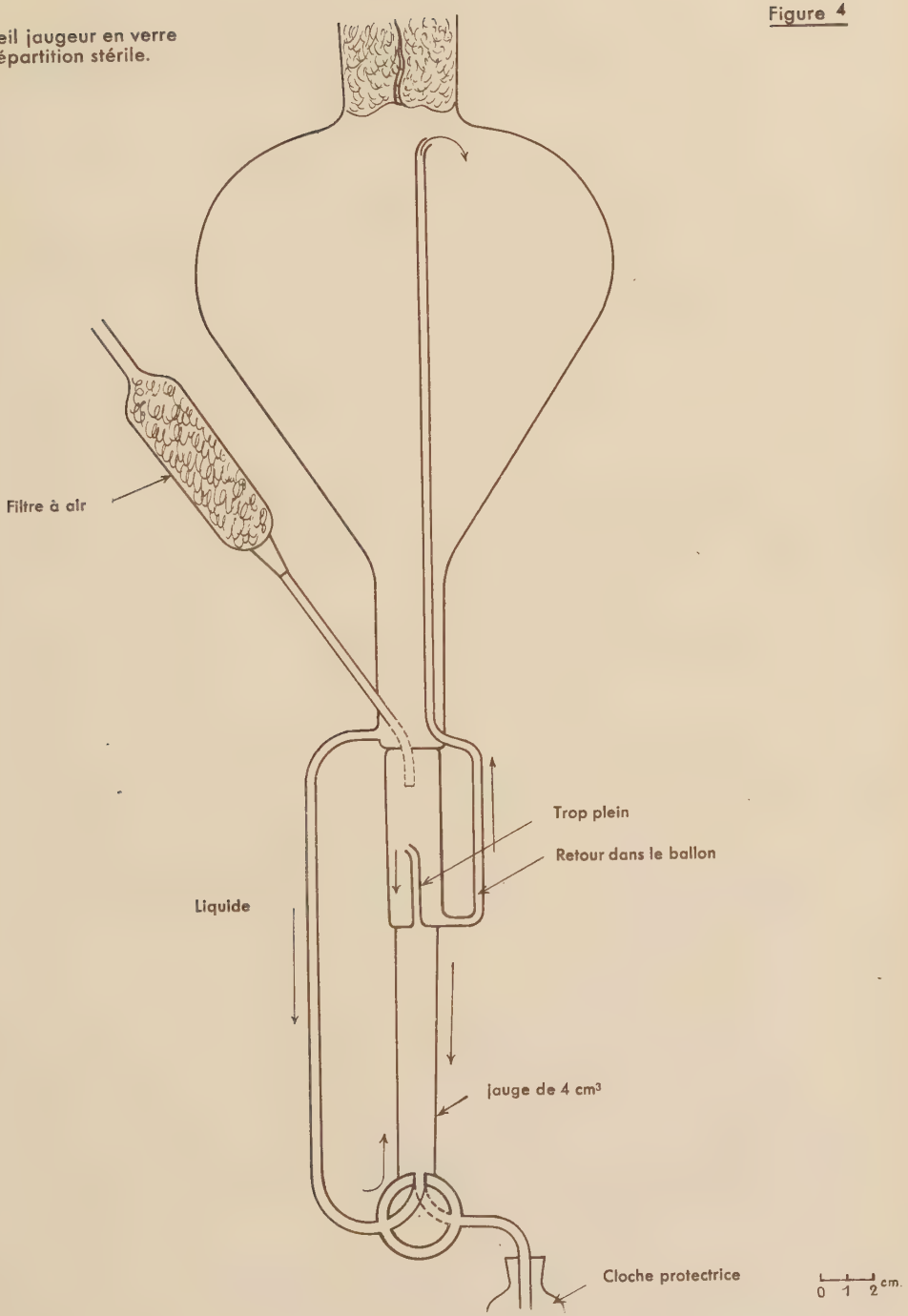
3°) Stockage du bouillon et des solutions.-

Les ballons, en verre Pyrex, comme toute notre verrerie, servent à stocker d'une part le bouillon stérile destiné à la préparation des dilutions, d'autre part les solutions à titrer et leurs dilutions. Dans le premier cas, ils sont stérilisés remplis de bouillon comme nous le verrons ultérieurement, et dans le second ils sont stérilisés vides et bouchés au coton cardé, au four Pasteur pendant une heure à 180°.

Leurs capacités iront de 25 cm3 à 2 litres environ, et leur nombre sera fonction de celui des titrages à effectuer quotidiennement.

Figure 4

Appareil jaugeur en verre
pour répartition stérile.



4°) Tubes à essais.-

Comme nous l'avons déjà signalé la réaction se fait dans des tubes à essais dans lesquels le bouillon est distribué à l'aide d'un des appareils décrits.

Notre choix s'est porté sur des tubes de verre Pyrex, ce verre ayant la propriété de ne pas céder d'alcalinité au liquide qui séjourne à son contact.

Il faut que tous les tubes soient du même calibre pour que la culture d'abord, et, à la fin de l'incubation, la lecture du titrage se fassent dans des conditions rigoureusement identiques (hauteur de bouillon dans le tube et épaisseur)

Nous avons choisi des tubes de 16 mm de diamètre et 160 mm de longueur dans lesquels le volume de liquide entrant en jeu dans le titrage occupe environ 1/4 de la hauteur du tube.

Ces tubes sont, comme nous l'avons vu, remplis aseptiquement de bouillon de titrage. Ils sont donc préalablement stérilisés au four Pasteur à 180° pendant une heure, après lavage à l'eau alcaline, rinçage soigneux à l'eau ordinaire pour éliminer les résidus de soude sur les parois, séchage et bouchage au coton cardé.

La distillation d'huiles volatiles du coton cardé qui peut se produire au cours de la stérilisation, particulièrement au cas où le chauffage a été trop élevé ou trop prolongé, n'a pas ici la même importance que dans le cas des pipettes.

Pourtant, il faut vérifier que les produits de distillation ne possèdent pas de pouvoir antiseptique, qui viendrait éventuellement au cours d'un titrage s'ajouter à l'action propre de la solution à doser.

Nous avons d'une part, recherché la dilution limite de pousse du Staphylocoque dans des tubes dont le coton était carbonisé et dans des tubes dont le coton était à peine jauni; d'autre part, nous avons effectué des titrages dans ces deux sortes de tubes.

1) Dilution limite de pousse du Staphylocoque.-

On a préparé une suspension du Staphylocoque dans du bouillon de titrage contenant 10 millions de germes par cm3. A partir de cette suspension, on a fait plusieurs dilutions que l'on a partagé entre des tubes à coton carbonisé et des tubes à coton non carbonisé, à raison de 3 tubes de chaque catégorie pour chacune des dilutions. Après 24 heures d'incubation à 37°, l'intensité de la culture a été évaluée par la mesure de la densité optique à l'électrophotomètre de MEUNIER de chacun des tubes de l'expérience (le zéro de l'appareil a été ajusté sur un tube de bouillon non ensemencé).

Quel qu'ait été le nombre initial de germes à l'ensemencement, toutes les cultures ont présenté un égal développement après 24 heures d'incubation dans les deux catégories de tubes.

Leur densité optique s'est trouvée comprise entre 300

et 350 pour tous les tubes sans exception. C'est donc qu'il n'y a eu aucune action antiseptique de la part des huiles volatiles carbonisées du coton cardé même dans le cas d'une faible concentration de germes.

2) Titrage d'une solution de Pénicilline.-

Le titrage d'une solution de Pénicilline a été effectué parallèlement dans les deux sortes de tubes, à raison de 3 titrages pour chacune qui nous donnèrent les résultats du tableau n° 13.

TABLEAU N° 13

Influence de la carbonisation des cotons bouchant les tubes de titrage

Activité en Unités par cm³			
dans tubes à coton carbonisé		*dans tubes à coton non carbonisé*	
12		13	
12,5	12,1	12	12,3
12		12	

Ces résultats nous permettent d'affirmer que les goudrons qui peuvent accidentellement se former dans les tubes au cours de leur stérilisation par chauffage du coton cardé qui les bouche ne possèdent aucun pouvoir antiseptique et sont sans influence sur les titrages dans les conditions où nous opérons. Nous ferons d'ailleurs remarquer que la carbonisation du coton est rare si l'on prend soin d'éviter le contact des tubes avec les parois chauffantes du four à stériliser.

b) Appareillage de préparation et de distribution des solutions.

Basée entièrement sur la mesure des volumes des produits à essayer, la méthode des dilutions exige une évaluation aussi rigoureuse que possible de ces volumes, et nécessite donc des instruments de mesure exactement contrôlés. Néanmoins, ils ne présentent aucune particularité et constituent le matériel classique de laboratoire.

1°) Pipettes.-

Il est seulement nécessaire de disposer de pipettes de 1 cm3 très précises, que l'on utilise à la préparation et à la distribution des dilutions dans les tubes de la réaction.

Quelques pipettes graduées de 10 cm3 seront également utiles pour préparer la suspension de Staphylocoques dont la dilution ne demande pas une grande précision.

Toutes nos pipettes sont en verre Pyrex, dont le faible coefficient de dilatation permet le flambage, et la stérilisation à haute température sans risques.

Comme nous le verrons ultérieurement, on mesure avec les pipettes de 1 cm3 des volumes de dilution le plus souvent inférieurs à 1 cm3 et différant entre eux de 25 mm3. Pour rendre aussi aisée que possible la mesure, il faut donc choisir des pipettes longues dont le diamètre intérieur est petit et grand l'écart entre deux graduations successives.

Nous avons d'abord utilisé des pipettes Levaditi de 1 cm3 graduées en 1/20 de cm3. Il convient de rappeler ici que les pipettes bactériologiques sont construites pour être utilisées en soufflant de façon à ce qu'il ne reste pas de liquide dans la pointe de la pipette. Comme le prouvent les chiffres que nous donnons ci-dessous (tableau n° 14), il est très important de souffler, pour avoir une précision satisfaisante : toutes les mesures faites par écoulement sans soufflage seront entachées d'une erreur par défaut. Cette erreur peut être importante. Elle est bien dûe au liquide résiduel de la pointe, puisque la pipette vérifiée par tronçons sur toute sa longueur s'est montrée exacte à moins de 2 pour 100 près, sauf pour la partie 0 à 0,2 cm3 donnant près de - 10 pour 100 d'erreur alors que cette erreur est tombée à + 0,5 pour 100 en soufflant (tableau n° 15).

TABLEAU N° 14

Vérifications des pipettes

LEVADITI

N° de pipette	*Erreur sans souffler*	*Erreur en soufflant*
N° 214	*- 3,5 p. 100*	*- 2,4 p. 100*
303	*- 4,77*	*- 2,73*
318	*- 7*	*- 3,6*

En soufflant on diminue donc l'erreur de 1 à 3 pour 100 suivant le diamètre intérieur de la pointe de la pipette.

Les mesures ne sont donc correctes que si l'on utilise la partie supérieure de la pipette, c'est-à-dire si l'on mesure les volumes entre deux divisions de la tige calibrée. La pointe donne une erreur importante, surtout si l'on utilise la pipette sans souffler.

Nous avons systématiquement examiné toutes nos pipettes et éliminé celles dont la précision était inférieure à

± 3 pour 100 (en soufflant).

Cependant, pour éviter toute erreur éventuelle dûe à l'oubli du soufflage, nous avons fait construire des pipettes de 1 cm3 à 2 traits gradués en 1/20 cm3 ou en 1/100 cm3 selon le modèle de la figure n° 5.

TABLEAU N° 15

Vérification des pipettes Levaditi par tronçons

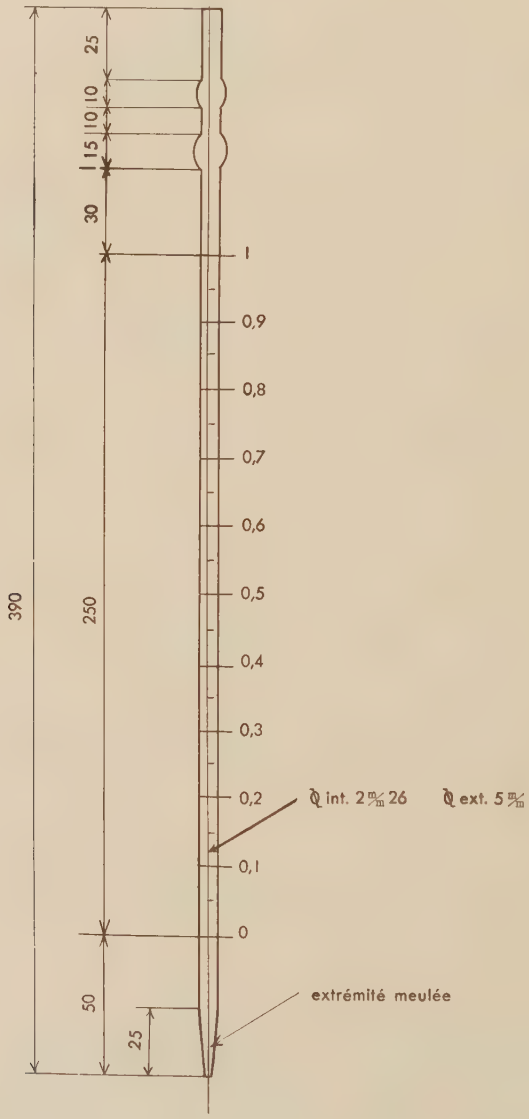
N° de pipette	Tronçon	Volume (1) Moyenne de 2 mesures sans souffler	Erreur pour 100	Volume Moyenne de 2 mesures en soufflant	Erreur pour 100
363	1 cm³ à 0	0 cm³ 9668	- 3,32	0 cm³ 9738	- 2,62
	1 cm³ à 0,8 cm³	0 cm³ 201	+0,5		
	0,8 à 0,6	0 cm³ 1992	- 0,4		
	0,6 à 0,4	0 cm³ 1975	- 1,25		
	0,4 à 0,2	0 cm³ 196	- 2		
	0,2 à 0	0 cm³ 180	- 10	0 cm³ 1913	- 4,35
	Total:	0 cm³ 9737			
364	1 cm³ à 0	0 cm³ 963	- 3,7	0 cm³ 978	- 2,2
	1 cm³ à 0,8	0 cm³ 197	- 1,5		
	0,8 à 0,6	0 cm³ 196	- 2		
	0,6 à 0,4	0 cm³ 197	- 1,5		
	0,4 à 0,2	0 cm³ 197	- 1,5		
	0,2 à 0	0 cm³ 182	- 9	0 cm³ 2001	+ 0,05
	Total:	0 cm³ 969			

(1) Les volumes indiqués sont les volumes trouvés en faisant la correction dûe à la poussée de l'air et à la variation de densité de l'eau, à la température de l'essai. On néglige la correction dûe à la dilatation du verre, celui-ci étant du Pyrex.

Le travail est fait avec ces pipettes exclusivement en pipettes à deux traits et l'erreur de pointe supprimée. La réfection éventuelle de la pointe sera possible sans incidence sur le volume de la pipette. Enfin, la boule supérieure remplie de coton constitue un filtre à air pratique, qu'on peut ne pas trop serrer pour ne pas diminuer la vitesse d'écoulement du liquide, et qui reste cependant suffisant. Ces pipettes nous ont donné entière satisfaction et nous ne saurions trop en recommander l'emploi.

Figure 5

Pipette de 1 cm³ — 2 traits au 1/20 de cm³



Emploi des pipettes - leur nettoyage et leur stérilisation.

Il n'est pas suffisant d'avoir des pipettes précises pour assurer l'exactitude des mesures. Il faut encore veiller à ce que les pipettes soient parfaitement dégraissées pour qu'il ne reste aucune gouttelette de liquide le long des parois. Si la pipette est grasse, la quantité de liquide qui y adhère peut être importante et dépend de la viscosité du liquide mesuré d'une part, et de la façon dont cette mesure est faite d'autre part.

Les mesures à la pipette sont souvent faites en bactériologie en tenant celle-ci horizontalement, l'écoulement du liquide n'est donc pas régulier et l'erreur de parallaxe importante : la mesure est presque certainement fausse.

Les expériences auxquelles nous nous sommes livrée nous ont prouvé qu'on ne compromettait pas la stérilité en travaillant avec des pipettes tenues verticalement, comme on le fait en technique chimique; le temps moyen adopté pour l'écoulement de 1 cm^3 de bouillon de titrage est 25 secondes.

Il est classique de stériliser toute la verrerie sèche bouchée au coton cardé, par chauffage au four Pasteur pendant 1 heure à 180°. La chaleur fait légèrement brunir le coton cardé, et surtout provoque la distillation des graisses qu'il contient. Les huiles volatiles viennent se déposer le long des parois de la pipette, que le liquide mouille alors mal. Il faut donc remédier à cet inconvénient; tout d'abord les pipettes doivent être immergées quotidiennement dans le mélange sulfochromique (nous les y mettons en fin de journée jusqu'au lendemain matin), rincées ensuite soigneusement à l'eau ordinaire, l'eau distillée, l'alcool et enfin séchées à l'éther. La pipette est alors parfaitement dégraissée et prête à être stérilisée. Pour arrêter les huiles volatiles, nous avons trouvé pratique et satisfaisant de remplir la boule supérieure de la pipette à moitié de coton hydrophile, et à moitié de coton cardé : le coton hydrophile suffit à retenir les graisses qui distillent et la pipette reste propre. Il ne serait pas bon de supprimer complètement le coton cardé qui constitue une protection supplémentaire contre une éventuelle aspiration de liquide trop forte.

Ainsi préparées, les pipettes sont mises dans de longs tubes dont le fond est garni de coton de verre et bouchés d'un tampon de coton cardé entouré d'une couche externe de coton hydrophile, puis stérilisées au four 1 heure à 180°.

Dans le but d'utiliser toujours la même pipette pour tous nos titrages et d'avoir ainsi des résultats parfaitement comparables, nous avons essayé de déterminer le nombre de titrages que l'on pouvait faire sans changer de pipette, et sans observer de souillures.

On a choisi deux pipettes : l'une pour la répartition des dilutions et l'autre pour l'ensemencement au Staphylocoque.

Elles ont été stérilisées au four comme nous venons de l'indiquer puis utilisées pendant plusieurs jours à raison de 25 à 30 titrages par jour. Entre chaque titrage les pipettes étaient lavées à l'alcool puis à l'éther et enfin au bouillon stérile. D'un jour à l'autre la pipette était laissée dans un

tube de mélange alcool-éther en conservant le même coton. Nous avons ainsi travaillé pendant plusieurs jours sans avoir une proportion de contaminations supérieure à celle que l'on observe en changeant de pipette à chaque titrage.

Nous avons même été jusqu'à faire toutes les manipulations d'un titrage avec une liqueur volontairement souillée (un ballon de bouillon non stérilisé) que nous avons fait suivre par le titrage d'une solution de Pénicilline après avoir nettoyé la pipette comme nous l'avons indiqué : le deuxième titrage n'a pas été souillé.

Comme nous l'avions déjà signalé ailleurs (11) le lavage des pipettes à l'alcool, éther puis bouillon stérile est donc suffisant à leur stérilisation. On peut donc utiliser toujours la même pipette sans aucune crainte, ce qui constitue une économie de matériel et de temps.

Néanmoins, pour augmenter la sécurité de notre travail, nous avons stérilisé notre pipette de titrage une fois par jour au four en changeant le coton et suivant les indications que nous avons données. Dans la journée la pipette était simplement lavée à l'alcool, éther et bouillon après chaque titrage.

2°) Fioles jaugées.-

Les fioles jaugées sont utilisées pour préparer toutes les dilutions que peut nécessiter la technique de titrage : dilution de la liqueur pour l'amener à un titre présumé dans les limites de la gamme de titrage employée.

Toutes les capacités sont nécessaires de 10 cm3 à 1.000cm3. Il est, en effet, important d'éviter les dilutions en série qui amènent immanquablement de grosses erreurs surtout dans le cas de liqueurs visqueuses. Il faut opérer de façon à avoir en une seule mesure la concentration désirée : ainsi une liqueur supposée titrer100 Unités/cm3 sera amenée à 0,3 Unité/cm3,titre convenable pour le titrage, en diluant 0,6 cm3 de cette solution dans une fiole jaugée de 200 cm3.

Nous nous sommes servie de fioles jaugées en verre Pyrex, bouchées émeri.

L'expérience nous a montré qu'il était inutile de stériliser ces fioles à la chaleur; il suffit d'y maintenir constamment quelques cm3 de mélange alcool éther que l'on vide juste au moment de l'emploi.

Lorsque la dilution est faite, on la transvase immédiatement dans un ballon stérile à l'aide d'une pipette à boule. La fiole jaugée est alors rincée à l'eau distillée stérile, puis au mélange alcool éther qu'on y laisse jusqu'à nouvel emploi. Elle peut ainsi immédiatement servir à la préparation d'une nouvelle dilution et il suffit d'une ou deux fioles de chaque capacité (10 - 25 - 50 - 100 - 150 - 200 - 250 - 500 - 1.000 cm3) pour effectuer toutes les dilutions dont on peut avoir besoin, aussi nombreuses soient-elles au cours d'une même journée.

c) Incubateur.-

L'incubation des tubes de titrages peut se faire soit en étuve à air, soit au bain marie.

Les armoires étuve dont on dispose habituellement sont le plus souvent insuffisamment calorifugées, et, par conséquent, sensibles aux variations de température extérieure; une paroi appuyée contre un mur présente une température régulière, mais une autre paroi proche d'une porte est refroidie (surtout en hiver), de telle façon que nous avons observé des différences de température pouvant aller de 34 à 39° suivant la paroi et le niveau où la mesure était faite. Ces armoires doivent de préférence être placées dans les chambres isothermes elles-mêmes; elles doivent de plus être aussi grandes que possible, pour que les porté -tubes n'y soient jamais juxtaposés et ne gênent pas les courants de convexion qui réalisent l'équilibre thermique.

Il est tout à fait important que tous les titrages soient à la même température : par exemple, si la série étalon se trouve à 34°, le Staphylocoque y poussera peu ou pas. Tout se passera apparemment comme s'il était inhibé par la Pénicilline à un taux élevé. Si, au contraire, les tubes des séries inconnues sont à la température convenable de 37°, le Staphylocoque y poussera normalement et le titre calculé en fonction d'un taux d'inhibition trop élevé pour le standard sera inférieur à la réalité.

Il est bon de veiller également au degré hygrométrique des étuves. Nous avons pensé que l'évaporation du contenu des tubes de titrages était à craindre. Aussi avons-nous pesé 6 porte-tubes de 22 tubes chacun environ avant leur mise en étuve et après 20 heures d'incubation (tableau n° 16).

TABLEAU N° 16

Modification du volume de bouillon pendant l'incubation

Porte-tubes N°	*Poids avant incubation*	*Poids après incubation*	*Perte par évaporation*
1	*1143,5 g.*	*1142,5 g.*	*1,0 g.*
2	*1066,0*	*1064,5*	*1,5*
3	*1129,0*	*1128,5*	*0,5*
4	*997,0*	*996,0*	*1,0*
5	*1293,0*	*1292,5*	*0,5*
6	*1139,0*	*1138,0*	*1,0*
Total :	*6767,5 g.*	*6762,0 g.*	*5,5 g.*

Sur 130 tubes contenant chacun 5 à 6 g. de liquide, il n'y a eu que 5,5 g. d'évaporation, soit 0,042 g. par tube. Cela est donc insignifiant et nous a prouvé que dans une petite armoire étuve, comme celle que nous utilisions, l'évaporation n'était pas à craindre. Nous pensons qu'il n'en est pas de même dans les chambres étuve, et que l'humidification de leur atmosphère est un facteur qu'il ne faut pas omettre.

Le bain marie ne présente aucun des inconvénients des étuves, à condition de le choisir à grande capacité calorifique. Comme nous le verrons par la suite, les tubes de titrages sont à 0° au moment de leur mise à incuber. Le temps de réchauffage de 0° à 37° peut demander plus d'une heure dans une étuve, surtout si l'on met à la fois beaucoup de tubes froids. Au contraire, l'équilibre est atteint en 1/4 à 1/2 heure au bain-marie, et si son volume est assez grand, sa température ne varie pratiquement pas quand on y plonge des tubes à 0°. Si l'on y adjoint un couvercle pour empêcher l'évaporation de l'eau, et une pompe qui à tout instant homogénéise cette eau, on peut être absolument certain d'avoir la même température à tous les points du bain marie, ce dont on n'est jamais assuré avec une étuve.

Nous avons utilisé avec toute satisfaction un bain-marie de 100 cm x 40 x 50 rempli à 150 litres d'eau et répondant aux exigences ci-dessus. Il peut contenir au maximum 35 supports de 15 tubes.

2°) BOUILLON DE CULTURE.-

Ainsi que nous l'avons déjà vu, nombreux sont les milieux de culture qui ont été employés pour le titrage de la Pénicilline par dilutions. Si le Staphylocoque est un germe de culture facile sur les milieux bactériologiques simples, il n'en est pas de même sur les milieux synthétiques. Pourtant, dans un but de standardisation des techniques de titrage , il serait intéressant de disposer d'un milieu chimiquement défini, et non pas de nature complexe comme le sont les milieux à base d'extraits de viande ou de levure, variables d'un fabricant à l'autre et même d'un échantillon à l'autre.

Il nous a pourtant bien fallu recourir à l'un de ces milieux et nous en avons étudié plusieurs parmi les plus simples.

Nos recherches ont porté d'une part sur des bouillons de viande, d'autre part sur des bouillons à base de peptone. Après avoir fixé notre choix, nous avons ensuite étudié l'influence du pH du bouillon dans les titrages et celle du mode de stérilisation.

a) Recherche d'un milieu de titrage.-

Notre but est ici l'établissement d'un milieu favorable à la culture du Staphylocoque, facile à préparer, aussi semblable à lui-même que possible. Nous avons, à priori, écarté les extraits de viande ou les extraits de levure dont les caractéristiques, teneur en azote, nature des acides aminés, diffèrent avec chaque échantillon, et avons porté nos efforts

sur les milieux à base de peptone.

Les qualités d'une peptone sont également très variables : mais leur fabrication industrielle courante permet de disposer d'un stock nécessaire au travail de plusieurs mois. Les peptones se conservent bien à l'abri de l'humidité.

Le bouillon de viande constitue le milieu bactériologique de base, et nous l'avons choisi comme point de départ de nos recherches.

Préparation du bouillon de viande.-

Elle a été conduite selon la technique classique donnée par A. CALMETTE, L. NEGRE et A. BOQUET dans leur Manuel Technique de Microbiologie et Sérologie; on laisse macérer 500 grammes de viande de boeuf dégraissée et hachée dans un litre d'eau du robinet froide, pendant 4 heures. On fait bouillir 10 minutes en remuant, puis après avoir exprimé la viande, filtré le liquide sur toile et refroidi, on filtre sur papier mouillé pour éliminer les graisses. On ajuste le pH à 7,5 à l'aide de lessive de soude diluée à 1/10; il se produit alors une précipitation de phosphates alcalino-terreux que l'on termine par un autoclavage à 120° pendant 20 minutes. On filtre le liquide bouillant dans l'autoclave sur papier CHARDIN.

On répartit alors suivant les besoins et on stérilise à 115° pendant 20 minutes.

Préparation des bouillons peptonés.-

D'autre part, nous avons préparé divers bouillons exclusivement à base de peptones variées et de composition suivante :

- peptone ..... 20 g.
- chlorure de sodium pur ..... 5 g.
- eau distillée q.s. pour 1.000 cm3

On fait simplement dissoudre la peptone et le chlorure de sodium dans l'eau. On ajuste à pH 7,5 à l'aide de lessive de soude diluée à 1/10. Il ne se produit pas ici de précipitation de phosphates alcalino-terreux; pourtant, si l'on porte à 120° certains bouillons peptonés (entre autres le bouillon de peptone VAILLANT 5 B et de peptone de WITTE que nous avons essayés), un louche plus ou moins important apparaît. Aussi, comme dans le cas du bouillon de viande, avons-nous maintenu ce temps de la préparation, inutile pour certaines peptones (peptone bactériologique U.C.L.A.F.) mais qui a l'intérêt de maintenir identiques les conditions opératoires pour les divers échantillons étudiés. Répartition et stérilisation sont faites comme pour le bouillon de viande.

Une remarque s'impose ici au sujet de l'ajustement du pH. Nous l'avons d'abord fait, en mesurant le pH à l'aide d'un indicateur coloré; le colorant convenable était dans le cas présent le bleu de bromothymol (B.T.B.); la comparaison était faite, soit en tube en utilisant la gamme de BRUERE et un comparateur de WALPOLE, soit simplement à la touche sur plaque de porcelaine en se référant pour l'appréciation de la coloration au tableau CLARK.

Des vérifications ultérieures du pH montrèrent des différences de plusieurs dixièmes d'unités pH suivant la méthode de mesure employée. Il est bon de faire remarquer ici que l'emploi des colorants est impropre à la mesure du pH de solutions peptonées, la peptone étant cause d'anomalies dans le virage de l'indicateur qui ne suit plus exactement le pH. Cette "erreur de peptone" existe également dans les mesures de pH effectuées au potentiomètre à électrodes de verre; il s'agit d'une polarisation rapide de l'électrode de verre qui ne répond plus exactement. Par contre, les mesures effectuées à l'ionomètre à électrodes d'antimoine sont satisfaisantes et ne sont pas sujettes à erreur. La polarisation est plus lente et les électrodes faciles à nettoyer. C'est avec ce dernier appareil que nous avons fait toutes nos mesures de pH.

Comparaison des divers bouillons.-

Outre le bouillon de viande, nous avons essayé 4 bouillons à base de peptone : U.C.L.A.F., 5 B VAILLANT, WITTE, CHAPOTEAUT, préparé comme nous venons de l'exposer.

Avant la stérilisation définitive, chaque bouillon a été distribué en tubes, à raison de 10 cm3 par tube. Chaque série a été ensemencée à l'aide d'une même suspension de Staphylocoques à raison de 7 à 8 millions de germes par cm3. Après leur ensemencement, tous les tubes sont optiquement vides. Les bouillons ensemencés sont portés à l'étuve à 37° et leur turbidité mesurée d'heure en heure, à partir de la 3ème heure d'incubation, à l'électrophotomètre de Meunier, avec écran rouge. Comme la couleur des différents bouillons n'est pas exactement la même, le zéro du photomètre a été ajusté à chaque mesure sur le bouillon vierge correspondant. La turbidité du milieu marque la pousse du germe et par suite la valeur nutritive de chaque milieu étudié. Nous donnons dans le tableau n° 17, les valeurs lues et les courbes correspondantes dans la figure n° 6.

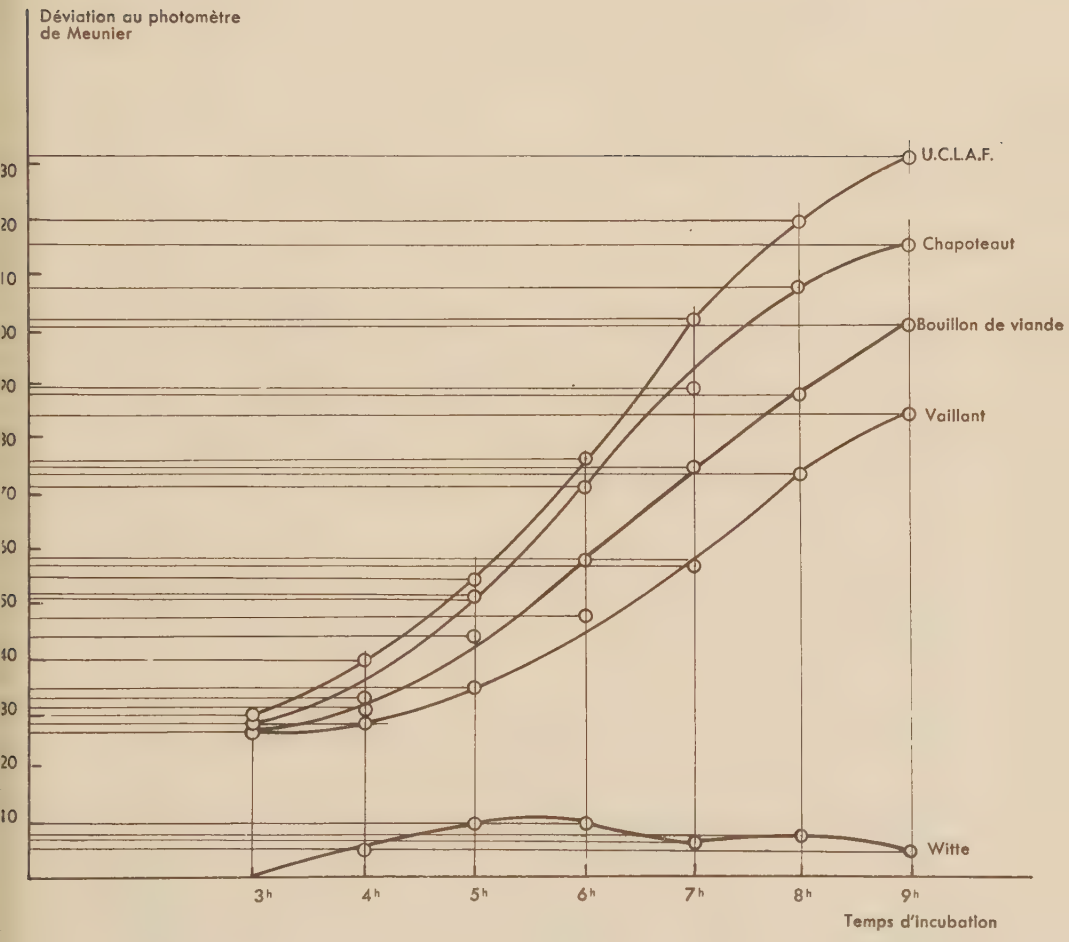
TABLEAU N° 17

Croissance du Staphylocoque sur divers bouillons peptonés

Déviation Photomètre	après 3 H	4 H	5 H	6 H	7 H	8 H	9 H
Pep UCLAF	29	39	56	79	100	120	128
	30	40	52	72	103	119	135
Pep VAILLANT	28	28	37	50	54	74	82
	25	28	32	47	60	72	87
Pep WITTE	0	5	9	9	6	8	5
	0	5	10	10	6	7	5
Pep CHAPOTEAUT	28	35	50	73	91	110	115
	28	30	51	69	89	115	115
bouillon de viande	26	31	43	60	72	85	100
	28	30	46	55	76	90	101

Courbe de croissance du staphylocoque sur divers bouillons peptonés.

Figure 6



Le meilleur milieu est celui dans lequel le Staphylocoque pousse le plus rapidement. C'est ici le bouillon à la peptone U.C.L.A.F. et celui à la peptone CHAPOTEAUT, avec cependant un léger avantage régulier en faveur du premier de ces milieux.

Nous avons donc arrêté notre choix sur la peptone bactériologique U.C.L.A.F. dont nous avons alors poursuivi l'étude tant du point de vue chimique que du point de vue bactériologique.

L'analyse chimique a donné :

- Azote total ..... 13,8 g. pour 100,
- Azote aminé ..... 2,04 g. pour 100,
- Cendres ..... 3,1 g. pour 100,
- Humidité ..... 1,9 g. pour 100.

Le bouillon à 20 g. de peptone par litre contient donc 0,69 g. d'azote total par litre.

L'étude bactériologique a consisté dans l'enregistrement de la courbe de croissance du Staphylocoque, dans le bouillon étudié en fonction du nombre de germes à l'ensemencement qui a varié de 10 millions à 100 germes par cm3, le nombre étant déterminé par numération à la cellule compte microbes. Cet enregistrement a été fait à l'aide du microbiophotomètre enregistreur de P. BONET-MAURY et A. WALEN. Nous reproduisons ici ces courbes établies en même temps pour la peptone CHAPOTEAUT (figure n° 7).

Cette étude plus fine nous montre que lorsqu'on diminue le nombre de germes d'ensemencement, la phase de latence est beaucoup plus longue, mais que la peptone U.C.L.A.F. donne un développement plus précoce et plus complet, puisqu'à 100 germes par cm3, la peptone CHAPOTEAUT ne donne plus aucune culture.

Pour accélérer encore la multiplication du Staphylocoque, nous avons de plus additionné le bouillon de 2 g. de glucose pur par litre.

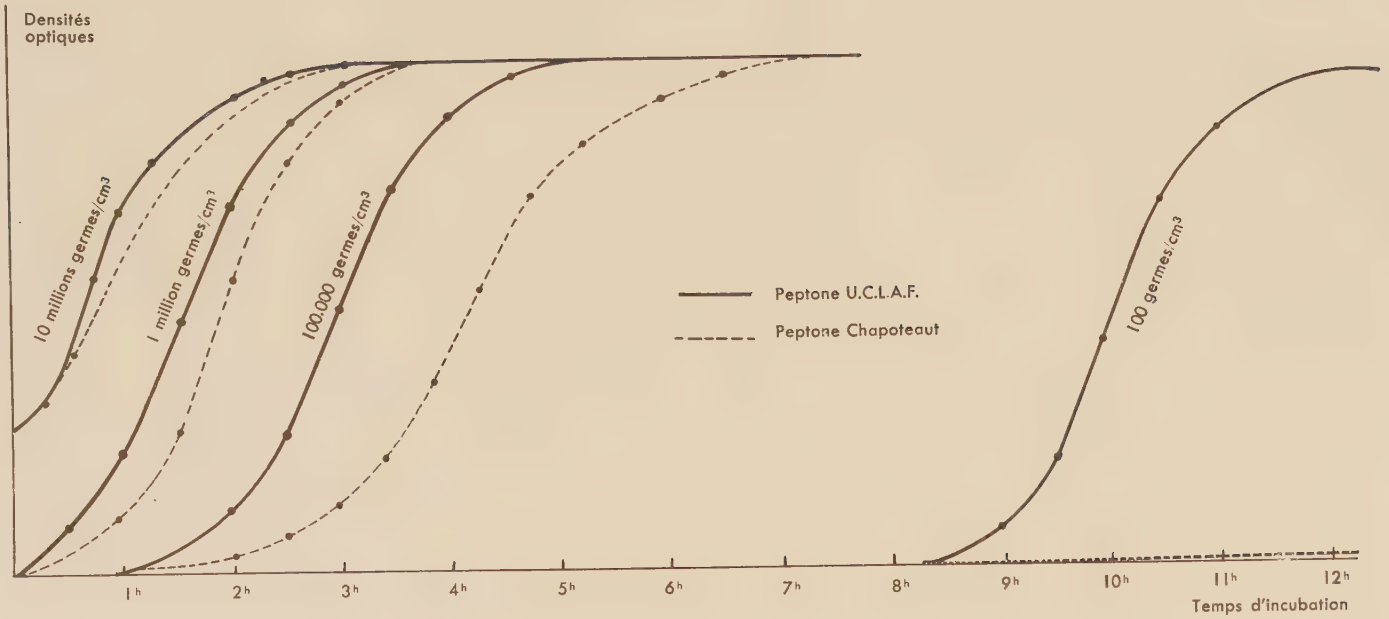
Nous avons enfin fait la courbe de croissance du Staphylocoque dans ce bouillon glucosé et le même bouillon non glucosé (turbidité évaluée au photomètre de Meunier); nous avons obtenu les résultats rapportés dans le tableau n° 18.

Les courbes correspondantes (figure n° 8) montrent que l'addition de glucose diminue la durée de la phase de latence en même temps qu'elle amplifie la multiplication du germe.

C'est donc à ce dernier bouillon peptoné (peptone U.C.L.A.F.) salé, glucosé que nous nous sommes arrêtée.

Figure 7

Courbes de croissance de la peptone bactériologique n° 13 UCLAF et de la peptone Chapoteaut, enregistrées au photomètre enregistreur de P. Bonet-Maury et A. Walen, en fonction du nombre de germes d'ensemencement.



Courbes de croissance du staphylocoque en milieu peptoné salé et peptoné salé glucosé.

Figure 8

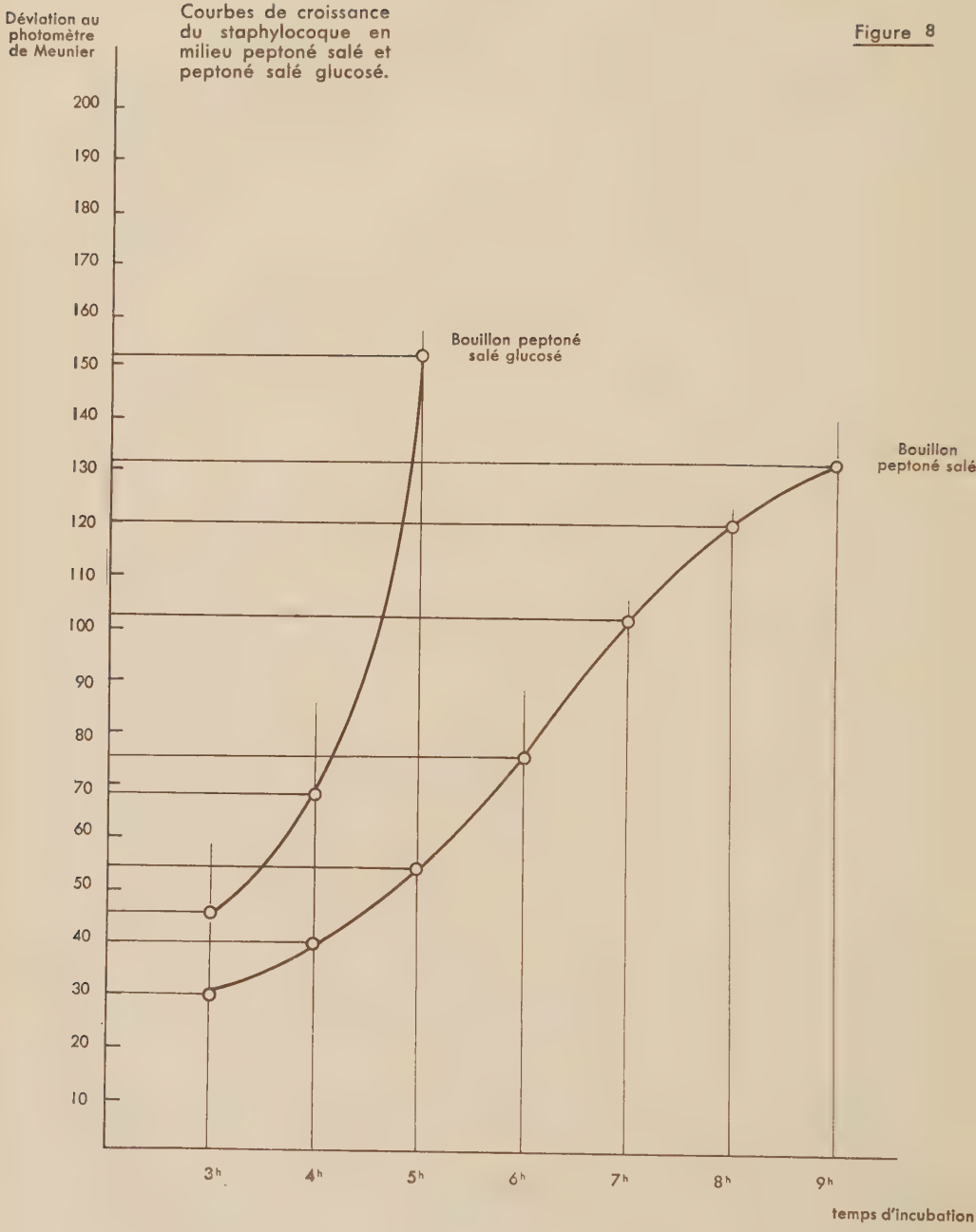


TABLEAU N° 18

Pousse comparée du Staphylocoque en milieu peptoné salé et peptoné salé glucosé

Temps d'incubation à 37°	*3H*	*4H*	*5H*	*6H*	*7H*	*8H*	*9H*
Peptone seule	*29* *30*	*39* *40*	*56* *52*	*79* *72*	*100* *103*	*120* *119*	*128* *135*
Peptone + glucose	*46* *45*	*59* *78*	*151* *152*	*>195* *>196*			

b) Importance du pH du bouillon.-

Nous avons vu que le pH du bouillon était ajusté à 7,5.

Au cours de l'autoclavage ce pH subit une chute que l'on a régulièrement observée et qui l'amène à 7,2 - 7,3.

Nous avons remarqué que cette baisse de pH est d'autant plus marquée que le pH d'origine est plus élevé, ainsi qu'en témoignent les chiffres suivants :

pH initial	pH après autoclavage
5,1	5,0
6,1	6,0
6,6	6,4
7,0	6,7
7,3	6,9
7,5	7,0
8	7,5
9	8,5

Nous avons choisi comme pH expérimental 7,2 - 7,3, pour diverses raisons :

On sait que les bactéries poussent plus facilement en milieu légèrement alcalin et que chacune d'elles possède une zone de pH dans laquelle la culture reste possible, et dans cette zone un pH optimum. D'après GASTINEL, la zone optima de culture du Staphylocoque est de 7,2 à 7,6. Il nous a donc paru indispensable de rester entre ces limites.

De plus, le sang est au pH de 7,35 et nous avons cru logique d'effectuer les mesures d'activité de la Pénicilline dans les conditions mêmes où elle se trouvera appelée à agir.

Il restait à savoir cependant dans quelle mesure les variations de pH du bouillon pouvaient influer sur l'activité antibactérienne de la Pénicilline, dans la zone où reste pos-

sible la culture du Staphylocoque.

Nous avons, dans ce but, préparé plusieurs bouillons ne variant entre eux que par leur pH, et nous avons effectué des titrages avec chacun d'eux. H. VELU, H. PENAU, et nous-même avons déjà eu l'occasion antérieurement d'attirer l'attention sur nos premiers essais (216).

On objectera que l'emploi d'un étalon de référence titré parallèlement aux produits inconnus rend moins impérieuse l'obligation d'opérer dans des conditions rigoureusement identiques d'un jour à l'autre.

Mais, il nous faut rappeler ici que nos recherches ont été entreprises avant qu'il fût possible de se procurer un standard. Nos travaux ont été poursuivis à leurs débuts exclusivement en valeur absolue, en adoptant l'unité OXFORD telle que l'avaient défini H. FLOREY et M.A. JENNINGS "la quantité de Pénicilline qui dissoute dans 50 cm3 de bouillon inhibe la culture de la souche de Staphylococcus aureus".

Pour pouvoir transmettre aux laboratoires chargés des recherches sur les cultures ou sur la purification de la Pénicilline des résultats comparables dans le temps, une rigueur expérimentale impitoyable était donc pour nous une nécessité absolue.

Des solutions de Pénicilline (jus de culture ou solutionsde produits plus ou moins purifiés) ont été titrées sur des bouillons de pH variés, ajustés à l'aide de lessive de soude à 1/10 ou d'acide phosphorique à 1/10. Tous les pH ont été vérifiés au moment du titrage à l'ionomètre à électrodes d'antimoine .

Les tubes témoins de culture du Staphylocoque ont été faits pour chacun des pH; tous ont poussé abondamment montrant que nous n'avions pas atteint les zones dysgénésiques de culture.

Le tableau n° 19 rapporte les titres observés après 20 heures d'incubation à 37° en admettant qu'une unité correspondе exactement à 1/50 (Unité FLOREY).

Selon le pH auquel elle est appelée à agir, l'activité de la Pénicilline exprimée en unités Florey varie donc dans de très larges limites : elle est très élevée aux pH bas. Bien que les témoins de pousse du Staphylocoque aient poussé normalement, il y a vraisemblablement eu démarrage plus lent de la culture aux pH bas; ce ralentissement est accentué par la Pénicilline présente qui, finalement, paraît posséder une très forte activité.

Au fur et à mesure que le pH s'élève, l'activité apparente de la Pénicilline diminue. Quand on atteint des pH supérieurs à 7,5 on pourrait penser que l'activité apparente va à nouveau augmenter, puisque la culture du Staphylocoque devient plus difficile peu à peu. Sauf dans un cas (échantillon n° 5) et à pH 8 seulement, l'expérience a montré que l'activité apparente continuait à s'abaisser. Nous pensons que là vient s'ajouter un autre phénomène, la destruction partielle de la Pénicilline, instable en milieu alcalin.

TABLEAU N° 19

Variations de l'activité apparente d'une solution de Pénicilline suivant le pH du milieu de titrage

(en unités FLOREY)

	Activité en Unités par cm³					
pH	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 4	Solution 5	Solution 6
5,0	35 35 35 35	35 35 35 35	250 250 250 250	18 18,5 18,5 17	24 22 23,6 25	– – –
6,0	35 35 35 35	35 35 35 35	170 174 176,3 185	14 13 13,6 14	18 17 18 19	– – –
6,1	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –	160 160 164 172
6,4	22 20 21,1 21,5	20 17 18,6 19	– – – –	– – – –	– – – –	– – –
6,5	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –	150 147 146 151
6,7	17 17 17 17	14 13,5 14,1 15	140 143 148 162	– – – –	– – – –	– – –
6,8	17 16,5 16,1 15	15 15,5 15,1 15	– – – –	– – – –	10 11 11,6 14	130 128 131 135
6,9	15,5 14,5 15 15	13 14 13,6 14	– – – –	– – – –	– – – –	– – –
7,0	– – – –	– – – –	– – – –	6 7 7 8	10 10,5 10 9,5	– – –
7,1	14 14 14 14	11 12 11,5 11,5	– – – –	– – – –	– – – –	– – –
7,3	– – – –	– – – –	100 100 100 100	6 6 5,6 5	8 8,5 8,1 8	– – –
7,5	9 11 10,6 12	9 8,5 8,8 9	– – – –	– – – –	– – – –	– – –
7,8	– – – –	– – – –	100 100 100 100	4 5 4,3 4	7 7,5 6,8 6	– – –
7,9	9 9 9 9	9 8 8,3 8	– – – –	– – – –	– – – –	– – –
8,0	– – – –	– – – –	100 100 100 100	– – – –	11 10 10,3 10	– – –
8,2	– – – –	– – – –	– – – –	5 5 4,6 4	– – – –	– – –
8,5	5 8 7 8	6 6,5 6,5 7	– – – –	– – – –	– – – –	– – –

Il y a donc intérêt, d'une part à se placer dans la zône optima de culture du Staphylocoque, d'autre part à rester dans les milieux faiblement alcalins pour éviter une destruction de Pénicilline. Ces deux exigences peuvent être conciliées si l'on choisit pour pH du bouillon de titrage 7,2 à 7,3.

c) Importance de la stérilisation du bouillon.

Les remarques d'ordre général que nous avons faitesau sujet de l'importance du pH du bouillon de titrage peuvent se répéter à propos de sa stérilisation.

La préparation classique des bouillons de viande comporte un autoclavage pour précipitation des phosphates alcalino-terreux et un autoclavage pour stérilisation finale. Le bouillon subit donc deux fois la température de 115 - 120°.

Bien que nous utilisions la peptone bactériologique U.C.L.A.F. qui ne précipite pas à 120°, nous avons néanmoins conservé ce temps de la préparation, certaines autres peptones donnant un précipité dans les mêmes conditions.

Nous avons recherché les conséquences éventuelles de passages à l'autoclavage répétés, pour savoir s'il était possible de stériliser une fois supplémentaire un bouillon de stérilité douteuse.

Un même lot de bouillon a été partagé en plusieurs fractions, auxquelles on a fait subir de 1 à 6 autoclavages.

Le premier autoclavage a été de 30 minutes à 120° et a correspondu au temps de précipitation des phosphates alcalino-terreux. Les suivants ont été de 20 minutes à 115°. Nous avons pu, dans le premier essai, ne faire qu'un autoclavage (20 minutes à 115°) grâce à l'absence de précipitation de la peptone employée.

La première remarque à faire concerne l'aspect du bouillon après ces divers chauffages : plus le nombre d'autoclavages est élevé, plus le bouillon prend une coloration foncée allant du jaune ambré pour 1 autoclavage, au brun foncé pour 6. Cette coloration brune provient vraisemblablement d'une caramélisation du glucose, et il était à prévoir que celle-ci entraînerait une modification du pouvoir nutritif du milieu.

Comme dans le cas précédent des solutions de Pénicilline ont été titrées sur chacun de ces bouillons et leur activité exprimée en Unités FLOREY (tableau n° 20).

Ces expériences montrent que le nombre des stérilisations du milieu de titrage n'est pas indifférent au résultat observé. La caramélisation du glucose, peut-être également une hydrolyse partielle de la peptone par chauffages répétés, diminuent la valeur nutritive du bouillon dans lequel le Staphylocoque a plus de difficultés à se développer. Cet affaiblissement du pouvoir nutritif du bouillon se fait particulièrement sentir à la limite d'activité de la Pénicilline essayée, qui se trouve repoussée et dont le titre paraît ainsi supérieur.

Il est donc indispensable de définir un mode de stérilisation et de s'y tenir pour assurer la régularité des titrages

TABLEAU N° 20

Variation de l'activité apparente selon la stérilisation du milieu (en Unités FLOREY)

Nombre de stérilisations	Activité en Unités par cm³			
	Solution N°1		Solution N°2	
1 Stérilisation	8 8,5 8	8,1	37 38,5 37	37,5
2 Stérilisations	9 9 9	9	38 38,5 40	38,8
3 Stérilisations	11,5 10 10	10,5	42 42 42	42
4 Stérilisations	12 12 11	11,6	46 45 44,5	45,1
5 Stérilisations	13 14 14	13,6	51 48 49,5	49,5

3°) GERME EMPLOYE.-

Nous avons vu qu'il existait une souche officielle de Staphylococcus aureus convenant aux titrages de Pénicilline. Nous avons pu en disposer après le rétablissement des relations normales avec les pays anglo-saxons, mais avant cela, nous avons eu l'occasion d'expérimenter des germes de diverses origines, provenant aussi bien de souches de collection que d'isolements récents sur des malades.

Ces expériences nous révélèrent des différences de sensibilité importantes des diverses souches à la Pénicilline : plusieurs solutions de Pénicilline ont été titrées à l'aide de diverses souches : R,O,C,T,H,L, la souche O étant une des souches officielles.

Nous donnons dans le tableau n° 21 les taux d'inhibition observés pour chacune d'elles.

Les souches O, C et L se montrent équivalentes, la souche R est un peu plus résistante à la Pénicilline, mais la souche T l'est beaucoup plus, alors que la souche H est au contraire très sensible.

TABLEAU N° 21

Sensibilité de diverses souches de Staphylococcus aureus à la Pénicilline

		Staphylocoque					
		R	O	C	T	H	L
Solution I	Taux d'inhibition	1/645 1/680 1/645	1/742 1/720 1/700	1/742 1/742 1/742	1/421 1/446 1/421		
	Moyenne	1/656	1/721	1/742	1/429		
Solution II	Taux d'inhibition	1/850 1/850 1/850				1/1152 1/1210 1/1276	
	Moyenne	1/850				1/1212	
Solution III	Taux d'inhibition	1/421 1/396 1/426					1/47 1/44 1/39
	Moyenne	1/412					1/439

Ici encore, comme lors de l'étude des différents bouillons, l'emploi d'un standard de Pénicilline fait disparaître la cause d'erreur dûe à la sensibilité variable du Staphylocoque à la Pénicilline. Mais, comme précédemment, ce te étude a été faite au moment où l'étalon nous faisait encore défaut.

Ces remarques ne sont néanmoins pas inutiles et mo trent que chaque facteur de la réaction doit être précisé. Quant on entreprendra l'étude d'un nouvel antibiotique d'or gine biologique, les recherches devront être conduites dans des conditions toujours identiques à elles-mêmes, particuli rement rigoureuses tant qu'il n'existera pas d'étalon de ré rence pour la nouvelle substance. Les résultats que nous av exposés apportent la preuve qu'une expérimentation de ce ge re conduite sans la précision opératoire nécessaire n'aurai aucun sens.

Entretien de la souche de Staphylococcus aureus.-

Le Staphylocoque est un germe banal et de culture cile. Nous avons pensé qu'il n'était pas nécessaire d'util des milieux à base de sang, pour entretenir la vitalité de tre souche, ceux-ci étant destinés surtout à exalter le po pathogène.

Des observations portant sur plusieurs semaines n

ont montré qu'un germe repiqué indéfiniment de jour en jour de bouillon à bouillon perdait peu à peu sa vitalité. Il est nécessaire de le régénérer en le faisant passer de temps en temps sur milieu solide et en faisant des isolements.

Nous nous sommes trouvée satisfaite du milieu simple constitué par notre bouillon de titrage gélosé à 20 pour 1000. A partir de la gélose initiale portant le germe, nous avons préparé un certain nombre de tubes de gélose par ensemencement en stries. Après 48 heures d'incubation à 37°, tous les tubes sont portés en glacière où ils sont conservés.

Au début de chaque mois, on prend l'un de ces tubes que l'on repique sur 5 tubes de gélose, conservés également en glacière après 24 heures d'incubation à 37°. Au début de chaque semaine, un de ces tubes est ouvert et le Staphylocoque repiqué sur bouillon; chaque jour de la semaine, le repiquage est fait de bouillon à bouillon, mais on n'utilise pour les titrages que le second passage sur bouillon. De cette façon, on évite les repiquages en cascade de jour en jour et l'on conserve une souche stable. Les géloses souches mensuelles peuvent se conserver plusieurs mois en glacière : après 3 à 4 mois, il est bon de régénérer le germe en faisant des isolements suivant les techniques bactériologiques habituelles. Quand on a obtenu des colonies isolées, on choisit les plus pigmentées que l'on ensemence à nouveau sur gélose. Ce sont ces tubes de gélose provenant de colonies isolées qui serviront à leur tour plusieurs mois aux repiquages mensuels.

Cette technique d'entretien de notre souche de Staphylocoque est le fruit d'observations surtout microscopiques sur les aspects des cultures (abondance, pigmentation) par repiquages successifs de bouillon à bouillon sans isolement de germes. Nous avons ainsi vu une dégénérescence progressive qui n'a été enrayée que par un rajeunissement des souches laissées au repos à la glacière.

4°) ETALON DE REFERENCE.-

Nous ne disposions pas de standard de Pénicilline au début de nos recherches, comme nous l'avons déjà précisé. Nos titrages étaient alors exprimés en valeur absolue; après avoir choisi pour valeur de l'unité Oxford la dilution inhibante 1/50, cela nous avait conduite à étudier de très près les conditions expérimentales, en pressentant les conséquences de leurs plus légères variations sur les résultats observés. Il ne fallait cependant pas oublier ce que l'unité utilisée comportait d'instable et d'arbitraire. Aussi avons-nous cherché à effectuer des titrages relatifs dès que possible.

Par l'intermédiaire de Monsieur le Professeur JANOT, nous pûmes nous procurer une petite quantité d'étalon international titrant 1 unité pour 2 mg 7, grâce à laquelle il fut possible de titrer comparativement de façon exacte divers échantillons de Pénicillines commerciales impures, destinés à nous servir d'étalon de travail. Ces Pénicillines mises en solution dans l'eau distillée stérile et titrées par rapport à l'étalon international furent ensuite réparties stérilement à la microburette en petites ampoules à raison de 2000 à 6000 unités par ampoule suivant les cas, séchées selon la méthode lyophile par distillation sous vide moléculaire après congélation à l'air liquide. Les ampoules scellées sous air rigoureu-

sement sec, contenaient alors une petite quantité de produit d'aspect plus ou moins spongieux.

Un dernier contrôle de sécurité toujours en fonction de l'étalon international était fait systématiquement sur quelques ampoules de chaque nouveau lot préparé.

On avait ainsi un étalon de travail secondaire en fonction duquel tous les titrages pouvaient être exprimés.

Ces ampoules de Pénicilline peuvent se conserver à la glacière plusieurs mois sans détitrage. Voici à titre d'exemple un de ces titrages comparatifs :

Exemple de titrage de Pénicillines commerciales en fonction de l'étalon international.-

a) Titrage d'un lot d'ampoules de Pénicilline (SA) contenant environ 2000 Unités par ampoule.

Dilution - 1 ampoule dans une fiole jaugée de 100 cm3 : sol. à 20 U/cm3.

Dilution à 1/60 = solution à 0,325 U/cm^3 environ.

b) Titrage d'un lot d'ampoules de Pénicilline (SN) contenant environ 7000 Unités.

Dilution - 1 ampoule dans une fiole jaugée de 250 cm3 : sol. à 28 U/cm3.

Dilution à 1/100 = solution à 0,28 U/cm3 environ.

c) Etalon international.-

Pesée de 6 mg 79 = 2515 Unités, mis en solution dans une fiole jaugée de 100 cm3 = solution à 25,15 U/cm3.

Dilution à 1/100 = solution à 0,251 U/cm3.

d) Résultats.-

Le taux d'inhibition est donné par la valeur 1/x de la dilution extrême active du produit essayé.

Nous donnons dans le tableau n° 22 la valeur de x (détail de chaque titrage et moyenne générale) pour chacune des 3 solutions ainsi que le titre final moyen correspondant pour les deux Pénicillines essayées (solution mère).

Les standards de travail ainsi préparés ont été d'abord des sels de sodium ou de calcium titrant de 500 à 1000 Unités au mg.

Ultérieurement, lorsqu'il devint de fabrication courante, on utilisa un sel de potassium de Pénicilline G cristallisée, dont le titre exact était déterminé par titrages chimiques (dosages à l'iode et à la N-éthyl pipéridine) d'une part, et par comparaison avec l'étalon international d'autre part.

En possession d'un étalon de travail sec, il fallait

TABLEAU N° 22

Titrages en fonction de l'étalon international

Etalon international		Pénicilline SA			Pénicilline SN		
x	Moyenne	x	Moyenne	Titre	x	Moyenne	Titre
5,5 5,73 5,5 5,73 5,73 5,5 5,73 5,73 5,5 5,5 6,45 6,0	5,71	6,8 6,62 6,8 7,2 7,0 7,42 8,2 8,2 7,92 7,0 7,2 6,29	7,22	1,89 U/cm³, soit 1890 U par ampoule	5,28 5,28 5,28 7,0 6,0 5,5 6,45 7,0 6,0 6,0 6,0 6,29	6,00	2,63 U/cm³, soit 6575 U par ampoule

chercher s'il était nécessaire de préparer quotidiennement la solution standard ou s'il était possible d'utiliser plusieurs jours la même, et dans l'affirmative, quelle devait être la fréquence de son renouvellement.

La stabilité des diverses Pénicillines mises en solution tamponnée ou non, a fait l'objet d'un certain nombre de travaux; c'est ainsi que R. DEUSTON et K.A. LEES (33) - (34) ont montré qu'une Pénicilline commerciale relativement impure (1280 Unités au mg) en solution en eau distillée à 100.000 Unités par cm3 conserve 90 pour 100 de son activité après 4 jours à 24° et 85 pour 100 après 3 semaines à 5°. En solution à 20.000 Unités par cm3, elle conserve 85 pour 100 de son activité après 14 jours à 24°.

En tampon phosphaté à pH 7, la même Pénicilline en solution à 100.000 unités par cm3 ne perd plus sensiblement d'activité en 14 jours à 24°. Tous les antiseptiques que ces auteurs ont essayé ont plutôt une action défavorable sur la conservation.

De leur côté W.M.M. KIRBY (116), J.S. GOTS et A.M. GLAZER (67) ont conclu que les solutions de Pénicilline sont stables à température ordinaire pendant 1 semaine et à la glacière pendant près de 2 mois, mais cette stabilité dépend du pH de la solution et du solvant utilisé.

R.G. BENEDICT, W.H. SCHMIDT et D.R. COGHILL et A.P. OLESON (10) utilisant de la Pénicilline G (sel de sodium pur) ont déterminé le temps nécessaire pour inactiver 50 pour 100 de l'antibiotique en solution aqueuse, à différents pH et à diverses températures (tableau n° 23).

TABLEAU N° 23

Temps nécessaire à l'inactivation de 50 pour 100 de l'activité de Pénicilline en solution (temps en heures) d'après R.G. BENEDICT

pH	0° C	10° C	24° C	37° C
2	4,25	1,30	0,35	–
3	24	7,6	1,7	–
4	197	52	12	–
5	2000	341	92	–
5,5	–	–		62
6	–	–	236	103
6,5	–	–	281	94
7	–	–	218	84
7,5	–	–	178	60
8	–	–	125	27,6
9	–	–	31,2	–
10	–	–	9,3	–
11	–	–	1,7	–

E.L. SMITH (201) a étudié la stabilité de la Pénicilline en solution dans l'eau distillée, en présence ou en absence de traces de métaux lourds, notamment de sels de cuivre et de zinc.

Une solution à 40.000 Unités par cm3 en eau distillée à 24° conserve :

60 % de son activité pendant 4 jours à pH 5,7
12 % " " 7 jours à pH 4,3
4 % " " 10 jours à pH 4,3

Il étudie également l'action de divers agents stabilisants, les meilleurs étant l'hexamétaphosphate de sodium à 0,5 pour 100, le citrate de sodium et la glycine. Il montre que les solutions concentrées se détériorent plus vite que les solutions plus diluées.

Par exemple avec une Pénicilline brute à 470 unités au mg, on a les pertes d'activité suivantes :

	à 24°	à 0°
- solution à 12.500 U/cm3	4 pour 100 par jour	1 pour 100
- solution à 62.000 U/cm3	8 pour 100 par jour	1 pour 100
- solution à 250.000 U/cm3	25 pour 100 par jour	4 pour 100

- pâte à 25 pour
100 d'eau ..... 25 pour 100 par jour 6 pour 100

G. HALLIWELL (80) étudiant la stabilité d'une Pénicilline impure en solution aqueuse, obtient des résultats quelque peu différents de ceux de R.G. BENEDICT rapportés plus haut et obtenus avec un produit pur. La destruction de la Pénicilline, au bout de temps variables exprimés en heures est la suivante (tableau N° 24).

TABLEAU N° 24

Stabilité de la Pénicilline en solution aqueuse d'après G. HALLIWELL

Température		4°		27°7		37°4	
Pour 100 de destruction		99 p. 100	50 p. 100	99 p. 100	50 p. 100	99 p. 100	50 p. 100
pH	2	14,4	2,15	1,24	0,2	–	–
	3	78,55	11,83	6,36	0,95	–	–
	4	773	114	72	11	–	–
	5	–	562	462	70	–	–
	6	–	–	–	334	712	107
	7	–	–	–	402	820	126
	8	–	–	241	36	74,6	11,3
	9	–	–	64,7	9,7	–	–
	10	–	–	14,6	2.2	–	–

R.V. PULVERTAFT et J. YUDKIN (165) montrent que la conservation est améliorée par l'ion phosphate; et L. HAHN (78) (79) montre que l'adjonction de citrate de sodium à la solution en eau physiologique permet la stabilisation même à 100°.

L'influence des phosphates a été également étudiée par R. PRATT (160) (161) et celle de la température et du pH par S. MOLINAS et H. WALCH (142).

Divers échantillons de Pénicilline, soit Pénicilline partiellement purifiée, soit Pénicilline G cristallisée, ont été mis par nous-même en solution tamponnée à pH 6,4. Les solutions obtenues ont été conservées en glacière et titrées régulièrement par rapport à un standard de Pénicilline mis en solution chaque jour. L'examen du tableau N° 25 qui résume les résultats obtenus montre que la Pénicilline est très stable en solution tamponnée, puisqu'il n'y a aucune perte sensible d'activité après une semaine de conservation même quand il s'agit de Pénicilline G cristallisée généralement considérée comme moins stable en solution que la Pénicilline impure.

En conséquence, il nous a paru inutile de renouveler

TABLEAU N° 25

Stabilité des solutions de Pénicilline

Durée de conservation	Pénicillinate de calcium Cheplin P (Sol. à 19,3 U/cm³)		Pénicillinate de calcium Cheplin A (Sol. à 18,8 U/cm³)		Pénicilline G cristallisée, sel de Potassium (Sol. à 41 U/cm³)	
0	18,2 18,8 19,6 18,8 19,6	19	20,5 17,4 18,8 18,8	18,8	42,8 41 39,6 39,5 43,8	41,3
1 jour	18,1 20,7 18,1 20 19,2	19,2	18,7 17,3 19 19,5 19	18,7	38 43 40 44 38,2	40,6
2 jours	18,4 18,7 20,5 20,5 20,7	19,7	19,5 17 19,9 19,9 18,2	18,9	41,5 42,5 38,5 40 40	40,5
3 jours	17,1 20 18,7 19	18,7	17,1 21,7 18 20	19,2	39,5 37 40 38 42,5	39,4
4 jours	18,2 19,5 17,6 18,4	18,4	20,4 18,5 19,3 18,6	19,2	42,9 39,3 40 38,8 41,2	40,4
6 jours	17,2 19,6 19 18,5	18,6	17,8 18,3 21,2 19,1	19,1	40 41 40,5 41 41	40,7
8 jours					41 41 41 40 39	40,4
10 jours					42 40,8 39,4 39,4 40,2	40,3

les solutions standards quotidiennement et nous n'en avons utilisé qu'une ou quelquefois 2 par semaine suivant nos besoins.

L'addition systématique de 1 pour 100 de chloroforme aux solutions prévient toute contamination accidentelle.

B - PROTOCOLE DE LA REACTION.-

1°) GAMME DE DILUTION.-

La gamme de dilution que nous avons choisie est l'aboutissement de plusieurs projets transformés peu à peu pour arriver à la forme définitivement adoptée.

Nous avons pris comme base de départ la technique de dilution indiquée par E.P. ABRAHAM, E. CHAIN, et leurs collaborateurs (in Levaditi p-31) (130) "à 1 cm3 de milieu de culture liquide on ajoute 0,5 cm3 de solution concentrée et filtrée de Pénicilline diluée au préalable à des titres divers (de 10 en 10). Chaque tube d'une série est alors ensemencé avec 1 goutte standard (0,04 cm3) d'une culture en milieu liquide, âgée de 24 heures, du microbe que l'on désire soumettre à l'examen. L'inhibition est indiquée par l'absence de trouble après 24 heures à 37°".

Dans cette technique l'écart entre deux dilutions successives de la gamme est donc très grand puisqu'il croît par puissances de 10. De plus, le volume total mis en jeu est petit (1,5 cm3) et rend plus difficile l'observation de l'inhibition. Enfin, la notion de "goutte standard" comme dose d'ensemencement nous a semblée assez imprécise et difficilement généralisable d'un laboratoire à l'autre.

Nous avons donc cherché :

- à augmenter le volume dans les tubes à réaction,
- à réduire l'écart entre deux dilutions successives,
- à augmenter le volume de l'ensemencement.

Le volume de 5 cm3 qui occupe 1/4 de la hauteur dans des tubes de 16 mm de diamètre et 160 de longueur nous a paru plus convenable à ce genre d'observations. Sur ces 5 cm3, nous avons posé, à priori, que 0,5 cm3 seraient constitués par une dilution convenable du germe d'essai que l'on ajouterait en fin d'opération après répartition de la Pénicilline à titrer dans les tubes.

Il est évident que le choix d'une gamme donnée (étendue de cette gamme et intervalle entre deux dilutions successives) dépend d'une hypothèse sur le titre présumé du produit à titrer. On se trouvera dans les conditions optima lorsque le titre réel se situera approximativement au milieu de la gamme choisie. Le choix de la gamme dépend également du taux d'inhibition moyen du standard dans un laboratoire déterminé. Si le standard à 5 unités par cm3 inhibe à 1/120 la gamme devra s'étendre de 1/50 à 1/300 par exemple, alors que si dans un laboratoire voisin les conditions expérimentales sont telles que l'inhibition se fait à 1/200, la gamme devra s'étendre jusqu'à 1/350 ou 1/400.

L'interprétation des résultats à la lecture sera d'autant plus facile que les intervalles seront plus larges, mais au détriment de la précision. D'où deux exigences en apparence incompatibles :

a) utiliser une gamme aussi étendue que possible,
b) utiliser des intervalles aussi étroits que possible.

Dans la pratique, on sera limité pour a) par la nécessité de ne pas multiplier outre mesure le nombre de tubes de la réaction, et pour b) par l'impossibilité de différencier à la lecture des concentrations trop rapprochées.

1°) Nous avons tout d'abord établi une gamme de titrage dans laquelle la dilution de la Pénicilline variait par 1/50 de tube en tube : 1/50 - 1/100 - 1/150 ...

La dilution finale obtenue dans le tube à expérience est l'aboutissement de plusieurs opérations de dilution successives : on ajoute à un volume constant de bouillon (4 cm3) un volume constant de dilution intermédiaire (0,5 cm3) de concentration 10 fois supérieure à la concentration désirée dans le tube à expérience. On a ainsi :

- dilution intermédiaire à 1/5 = 1 cm3 jus inconnu + 4 cm3 eau stérile

- 0,5 cm3 dilution 1/5 dans 4 cm3 bouillon
+ 0,5 cm3 suspension Staphylocoques=1/50

- dilution intermédiaire à 1/10 = 1 cm3 jus inconnu + 9 cm3 eau stérile

- 0,5 cm3 dilution 1/10 dans 4 cm3 bouillon
+ 0,5 cm3 suspension Staphylocoques=1/100

- dilution intermédiaire à 1/15 = 1 cm3 dilution à 1/10
+ 0,5 cm3 eau stérile

- 0,5 cm3 dilution à 1/15 dans 4 cm3 bouillon
+ 0,5 cm3 suspension Staphylocoques = 1/150

- dilution intermédiaire à 1/20 = 1 cm3 dilution à 1/10
+ 1 cm3 eau stérile

- 0,5 cm3 dilution à 1/20 dans 4 cm3 bouillon
+ 0,5 cm3 suspension Staphylocoques = 1/200,

etc...

Dans tous les tubes du titrage il y a donc rigoureusement le même volume final et les conditions sont identiques. Cependant, ce système présente 2 inconvénients : l'emploi d'une dilution intermédiaire augmente l'erreur finale, puisque le nombre de mesures à la pipette est doublé. De plus, la préparation extemporanée de ces dilutions intermédiaires est extrêmement longue et nécessite un nombre de tubes double du nombre nécessaire à la réaction proprement dite.

Cette façon d'opérer est donc inutilisable lorsqu'on a à effectuer de nombreux titrages comme c'est nécessaire dans l'industrie.

2°) Nous avons alors cherché à supprimer les dilutions intermédiaires ou du moins à n'en utiliser que quelques-unes et à réaliser la dilution définitive dans le tube de liqueur ajoutée au bouillon de culture, de façon à obtenir un volume définitif le plus voisin possible de 5 cm3, mais pas toujours égal à 5 cm3.

Nous avons imaginé une gamme de titrage donnant les dilutions jusqu'à 1/1500 croissant par 1/25 avec seulement 3 dilutions intermédiaires préparées en fioles jaugées, en employant un volume constant de 3,5 cm3 de bouillon préalablement répartis dans les tubes.

- Liqueur à titrer diluée à 1/10 :

1 cm3 de dil. 1/10 ds. 3,5 cm3 bouillon
+ 0,5 cm3 suspension staphylocoques = 1/50,

0,63	- d° -	- d° -	= 1/76
0,41	- d° -	- d° -	= 1/107
0,35	- d° -	- d° -	= 1/147
0,29	- d° -	- d° -	= 1/170
0,25	- d° -	- d° -	

- Liqueur à titrer diluée à 1/50

1,3	- d° -	- d° -	= 1/200
1,15	- d° -	- d° -	= 1/223
1	- d° -	- d° -	= 1/250
0,90	- d° -	- d° -	= 1/272

- Liqueur à titrer diluée à 1/100

1	- d° -	- d° -	= 1/500
0,95	- d° -	- d° -	= 1/521
0,90	- d° -	- d° -	= 1/544

etc...

Le volume final dans le tube n'est pas constant ici. Il varie de 4,25 cm3 à 5,3 cm3, soit 1 cm3 entre les tubes extrêmes.

Cependant, cette technique s'est à l'usage montrée peu satisfaisante bien que beaucoup plus rapide que la précédente. La difficulté réside dans le cas présent, dans la mesure à la pipette de volumes de dilutions très voisins ne différant entre eux que par quelques centièmes de cm3. Cette mesure nécessite des pipettes graduées en centièmes de cm3 très précises dont la manipulation est toujours délicate et qui sont difficiles à se procurer.

De plus, dans cette technique comme dans la précédente, la précision de la gamme varie beaucoup entre ses extrémi-

tés. Dans les titres bas, l'erreur est, entre 1,5 et 2 unités par exemple, de 25 pour 100 pour une différence de lecture de 1 tube, alors que dans les titres élevés, entre 25 et 25,5 unités, cette erreur tombe à 2 pour 100.

Cette seule raison devait suffire à nous faire rechercher un autre rythme de dilution.

3°) Il nous fallait donc établir une gamme de titrage qui réponde aux caractéristiques suivantes :

- utilisable pour toutes les solutions, même très diluées (une solution concentrée pouvant toujours être préalablement diluée),
- présentant une précision régulière sur toute son étendue,
- ne faisant intervenir qu'un minimum de dilutions intermédiaires,
- employant des volumes de dilution assez grands pour qu'ils varient entre eux par 1/40 cm3 au moins, ce qui diminue l'erreur de mesure et permet de supprimer l'emploi de pipettes graduées à 1/100.

L'idéal était de supprimer complètement les dilutions intermédiaires et en partant d'une solution quelconque de ne faire qu'une seule dilution que l'on répartit à doses convenables dans les tubes de la réaction.

Nous avons d'abord préparé une solution standard à faible concentration - 3 unités par cm3 - et recherché sa dilution inhibante moyenne dans les conditions expérimentales où nous opérions, en suivant la première gamme de titrage précédemment exposée, légèrement modifiée pour avoir des dilutions croissantes : 1/10, 1/20, 1/30, 1/40... 1/100...

L'inhibition s'est toujours faite aux environs de 1/70.

Comme le volume moyen de bouillon dans les tubes est 5 cm3, il n'était pas possible avec une solution à 3 unités par cm3, de réaliser en une seule opération la dilution 1/70, qui aurait nécessité la répartition de 0,07 cm3 dans le tube limite.

Nous avons donc choisi comme titre de départ non plus 3 Unités par cm3, mais 0,3 Unités par cm3, dont la dilution inhibante se place aux environs de 1/7, dilution facile à réaliser dans le tube à expérience.

Il fallait donc ensuite concevoir la gamme de dilution de façon que ce taux en occupe le milieu.

Comme nous savions déjà par nos expériences précédentes qu'entre 4,5 et 6 cm3, les conditions de pousse du Staphylocoque étaient comparables, nous n'avons utilisé que des tubes de bouillon préalablement remplis avec 4 cm3 de bouillon.

De plus, nous nous sommes arrangée pour que deux volumes successifs de dilution à mesurer à la pipette diffèrent entre eux de 1/40 cm3 au minimum.

Nous sommes ainsi arrivée à la gamme consignée dans le tableau n° 26.

Cette gamme de dilution s'applique à des solutions dont le titre probable est connu d'avance avec une certaine exactitude.

TABLEAU N° 26

Gamme I pour titrage précis

N° des tubes	Volume en cm³ de dilution à 0,3 U/cm³ présumée	Volume total de chaque tube de la réaction	Dilution finale obtenue
1	1,500	6,00	1/4
2	1,450	5,950	1/4,1
3	1,400	5,900	1/4,21
4	1,350	5,850	1/4,33
5	1,300	5,800	1/4,46
6	1,250	5,750	1/4,6
7	1,200	5,700	1/4,75
8	1,150	5,650	1/4,91
9	1,100	5,600	1/5,09
10	1,050	5,550	1/5,28
11	1,000	5,500	1/5,5
12	0,950	5,450	1/5,73
13	0,900	5,400	1/6,0
14	0,875	5,375	1/6,14
15	0,850	5,350	1/6,39
16	0,825	5,325	1/6,45
17	0,800	5,300	1/6,62
18	0,775	5,275	1/6,8
19	0,750	5,250	1/7,0
20	0,725	5,225	1/7,2
21	0,700	5,200	1/7,42
22	0,675	5,175	1/7,66
23	0,650	5,150	1/7,92
24	0,625	5,125	1/8,2
25	0,600	5,100	1/8,5
26	0,575	5,075	1/8,82
27	0,550	5,050	1/9,08
28	0,525	5,025	1/9,57
29	0,500	5,000	1/10,0
30	0,475	4,975	1/10,47
31	0,450	4,950	1/11,0
32	0,425	4,925	1/11,58
33	0,400	4,900	1/12,25
34	0,375	4,875	1/13,0
35	0,350	4,850	1/13,85
36	0,325	4,825	1/14,84
37	0,300	4,800	1/16,0

D'ailleurs, dans la pratique courante, on ne fera que quelques tubes autour du tube seuil présumé.

Un exemple explique clairement la manière d'opérer. Si le standard à 0,3 unité par cm3 inhibe généralement aux environs de 1/7, la solution inconnue amenée à ce titre présumé sera titrée un peu au-dessus et un peu au-dessous de ce taux avec les tubes :

N° 10 = 1/5,28 - 12 = 1/5,73 - 13 = 1/6,0 - 15 = 1/6,29,

17 = 1/6,62 - 19 = 1/7,0 - 20 = 1/7,2 - 21 = 1/7,42,

22 = 1/7,66 - 23 = 1/7,92 - 25 = 1/8,5 - 27 = 1/9,08.

Si le titrage est fait entre les deux limites extrêmes de la gamme on voit que l'on peut faire une erreur de 100 pour 100 en plus ou en moins (inhibition à 1/4 ou à 1/16) dans l'approximation du titre inconnu par rapport au milieu de la gamme (sans pour cela sortir de celle-ci). Mais, si le titre présumé de la solution est inconnu, on utilisera avec avantage la gamme de titrage n° 2, calculée comme la précédente mais avec des intervalles beaucoup plus larges, partant de la même limite inférieure 1/4 et allant jusqu'à 1/46 (tableau n° 27).

Cette gamme ne donnera évidemment pas un résultat très précis. Elle ne peut être utilisée que pour des titrages d'orientation qui seront obligatoirement suivis d'un titrage précis suivant la gamme n° 1, lorsque le titre présumé du produit à essayer sera déterminé avec une approximation convenable

Dans la pratique, soit que l'on connaisse avec assez de précision le titre présumé de l'échantillon (produit fini pur, liqueur de culture qu'on suit depuis le début de la fermentation), soit qu'on l'ait déterminé approximativement par un titrage utilisant les dilutions du tableau n° 27, il est toujours possible de faire une dilution à 0,3 Unité par cm3 suffisamment approchée pour faire un titrage précis en limitant la réaction à 12 tubes suivant le tableau n° 28.

Quand on aura à faire des titrages demandant une haute précision (titrages de standards) on pourra néanmoins se reporter au tableau n° 26 et faire des réactions de 18 ou 24 tubes consécutifs, ce qui réduira au minimum l'écart possible entre deux tubes successifs.

La gamme de dilution établie, il s'agit ensuite de préparer le produit à titrer de façon à l'amener à une concentration satisfaisante pour le titrage.

TABLEAU N° 27

Gamme II pour titrage d'orientation

N° des tubes	Volume en cm³, dilution à 0,3 U/cm³ présumée	Volume total de chaque tube de la réaction	Dilution finale obtenue
1	1,500	6,00	1/4
2	1,300	5,800	1/4,46
3	1,100	5,600	1/5,09
4	1,000	5,500	1/5,5
5	0,900	5,400	1/6,0
6	0,750	5,250	1/7,0
7	0,650	5,150	1/7,92
8	0,550	5,050	1/9,08
9	0,500	5,000	1/10,0
10	0,450	4,950	1/11,0
11	0,400	4,900	1/12,2
12	0,350	4,850	1/13,8
13	0,325	4,825	1/14,8
14	0,300	4,800	1/16,0
15	0,275	4,775	1/17,3
16	0,250	4,750	1/19,0
17	0,225	4,725	1/21,0
18	0,200	4,700	1/23,5
19	0,175	4,675	1/26,7
20	0,150	4,650	1/31,0
21	0,125	4,625	1/37,0
22	0,100	4,600	1/46,0

2°) PREPARATION DE LA DILUTION INCONNUE.-

Le produit à titrer peut être soit un produit sec, sel de sodium, de calcium ou de potassium de Pénicilline, ultime stade d'une fabrication, soit une liqueur contenant de la Pénicilline, liqueur de culture, ou bien liqueur représentant une phase du traitement chimique de culture.

a) Cas des produits secs.-

La dilution de travail à préparer dépend obligatoirement de l'hypothèse que l'on fait sur le titre du produit qu'il s'agisse d'un produit sec ou d'une liqueur.

Le cas d'une poudre se ramènera d'ailleurs au cas des liqueurs dès que celle-ci aura été mise en solution.

Deux éventualités peuvent se présenter :

Il s'agit seulement de déterminer l'activité par mg de poudre, ou bien encore il s'agit en plus de cette détermination de s'assurer que l'activité renfermée dans un flacon de Pénicilline commerciale correspond bien au nombre d'unités indiquées

TABLEAU N° 28

Gamme III pour titrage précis d'une solution connue dans le travail de routine (extraite du tableau n° 26).-

N° des tubes	Volume en cm³ de dilution à 0,3 U/cm³ présumée v	Volume total par tube en cm³ V	Unités de Pénicilline par tube pour une solution à 0,3 cm³ exactement	Unités de Pénicilline par cm³ dans chaque tube pour une solution à 0,3 U/cm³ exactement
1	1,5	6	0,45	0,075
2	1,25	5,75	0,375	0,0652
3	1,1	5,6	0,33	0,0589
4	1,	5,5	0,3	0,0545
5	0,9	5,4	0,27	0,05
6	0,8	5,3	0,24	0,0452
7	0,75	5,25	0,225	0,0428
8	0,7	5,2	0,21	0,0403
9	0,65	5,15	0,195	0,0378
10	0,6	5,1	0,180	0,0352
11	0,55	5,05	0,165	0,0326
12	0,5	5	0,15	0,03

sur l'étiquette.

Dans le premier cas, on pèse sur une balance à 1/10 mg une petite quantité de produit.

Il convient de rappeler ici que la Pénicilline est très hygroscopique particulièrement sous forme de sel de sodium, et cette propriété a fait l'objet d'études de C. CARRE et J.A. RIDDICK (23) ainsi que de H. BRINDLE et W.G. KEEPE (17) La préparation de la solution exige des précautions minutieuses pour éviter des erreurs importantes : il est nécessaire de mettre en oeuvre une quantité de produit relativement assez forte pour diminuer les erreurs de pesée,et d'effectuer celle-ci aussi rapidement que possible; 30 à 50 mg représentent un poids mesurable avec une bonne précision, que l'on met en solution dans une fiole jaugée de 100 cm3. On a ainsi une solution dont on calcule le titre présumé par cm3 d'après le poids exact de la prise d'essai.

Il faut ensuite, par une dilution ultérieure, amener cette solution à un titre situé dans les limites de notre gamme de titrage. L'expérience nous a montré que la gamme que nous avons calculée convient pour tous les titres compris entre 0,15 et 0,6 unité par cm3, et qu'une solution à 0,3 unité par cm3 inhibait à 1/7 environ, dilution située approximativement au milieu de la gamme.

Il était donc indiqué de ramener tous les produits à titrer à la concentration présumée de 0,3 unité par cm3.

Il serait évidemment souhaitable d'amener en une seule étape le produit inconnu à cette concentration. Ce n'est généralement pas possible en ce qui concerne les produits secs dont l'activité est habituellement supérieure à 1.000 unités par mg, mais il faut s'efforcer néanmoins de limiter le plus possible le nombre des opérations successives, et surtout d'éviter les dilutions en série : 1/10 → 1/100 → 1/1000, telles qu'on les a fait généralement dans les techniques bactériologiques de dilutions, et qui sont l'origine d'erreurs importantes.

En deux dilutions successives seulement, on peut toujours arriver à la concentration de 0,3 unité par cm3. Ces dilutions seront faites en fiole jaugée suivant le tableau n° 29 qui indique pour une hypothèse donnée le volume de liqueur inconnue à verser dans la fiole jaugée de capacité convenable. Pour obtenir une dilution finale à 0,3 unité par cm3, nous avons préféré utiliser des hypothèses compliquées quelconques et n'avoir à mesurer que des volumes facilement appréciables avec précision à l'aide de nos pipettes, plutôt que de calculer le volume à mesurer en fonction d'une hypothèse simple. Le poids de la prise d'essai ainsi que l'hypothèse de chacune des dilutions effectuées seront soigneusement notés pour le calcul du titre du produit essayé.

Lorsqu'il s'agit de déterminer le titre moyen par flacon d'un lot de fabrication, on procédera un peu différemment : un minimum de 3 flacons par lot sera utilisé au titrage bactériologique. Chacun de ces flacons sera pesé plein, puis vide après avoir mis en solution la Pénicilline qu'il contient et soigneusement rincé et séché les flacons. La différence entre les deux pesées représente le poids par flacon.

Une seule solution peut être faite avec le contenu des trois flacons, et un titre moyen calculé par flacon et par mg de produit sec.

Ainsi 3 flacons de 100.000 Unités seront mis en solution dans une fiole jaugée de 500 cm3, ce qui donnera une première solution à 600 Unités par cm3, puis 0,5 cm3 de cette dernière solution dilué dans une fiole jaugée de 1.000 cm3 pour obtenir la dilution de travail à 0,3 Unité par cm3.

Nous avons toujours fait nos solutions dans des fioles jaugées et stérilisées par lavage à l'alcool éther comme nous l'avons déjà indiqué. Le solvant employé peut sans inconvénients être de l'eau distillée stérile, mais il est préférable pour augmenter la stabilité des solutions, d'employer une solution tamponnée. Nous avons utilisé indifféremment l'une des deux formules suivantes :

a) Tampon phosphaté à pH 6,4.-

- Phosphate disodique cristallisé à 12 OH_2..... 7,7 g.
- Phosphate monopotassique cristallisé anhydre ..... 6,1 g.
- Eau distillée q.s. pour 1.000 cm3

On termine l'ajustement à l'aide d'acide phosphorique à 1/10.

TABLEAU N° 29

Tableau des dilutions à effectuer pour avoir 0,3 Unité par cm3, et de l'hypothèse qui en résulte.

Hypothèse en U.I/cm³	Volume de liqueur en cm³	Fiole jaugée de n cm³
10	0,75	25
15	0,95	25
20	0,75	50
25	0,6	50
30	0,5	50
35,3	0,85	100
40	0,75	100
46,1	0,65	100
50	0,6	100
54,5	0,55	100
60	0,5	100
64,25	0,7	150
69,2	0,65	150
75	0,6	150
81,8	0,55	150
90	0,5	150
100	0,6	200
120	0,5	200
150	0,5	250
176,5	0,85	500
200	0,75	500
230	0,65	500
250	0,6	500
272	0,55	500
300	0,5	500
333	0,9	1000
353	0,85	1000
375	0,8	1000
400	0,75	1000
428	0,7	1000
460	0,65	1000
500	0,6	1000
545	0,55	1000
600	0,5	1000

Au-delà, faire une première dilution à 1/10 suivant:

1 / 10

puis, une seconde dilution suivant le tableau ci-dessus, avec hypothèse :

64,25 - 69,2 - 75 ...,

la gamme permettant le titrage jusqu'à 6000 unités par cm³.

On stérilise à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°.

b) Tampon citraté à pH 6,4.-

- Citrate trisodique ..... 1,4 g.
- Chlorure de sodium ..... 7,5 g.
- Eau distillée q.s. pour 1.000 cm3

Le pH spontané est 6,4. On stérilise comme précédemment.

Comme garantie supplémentaire de stérilité des solutions, la solution tampon était préalablement additionnée de 1 pour 100 de chloroforme et agitée vigoureusement pour en assurer la dissolution.

b) Cas des liquides.-

Une fabrication de Pénicilline nécessite de nombreux contrôles soit en cours de fermentation, soit en cours d'extraction. Ici le produit inconnu ne sera pas un produit sec, mais une liqueur.

Comme dans le cas précédent, la dilution à faire dépend du titre supposé. Mais il sera là généralement possible d'amener la liqueur au titre de 0,3 unité par cm3 en une seule mesure, sauf si les concentrations des solutions atteignent plus de 600 unités. Les dilutions à faire sont celles indiquées par le tableau n° 29 ci-dessus.

Lorsqu'il s'agit de diluer des solutions dont la viscosité s'apparente à celle de l'eau, l'opération ne présente pas de difficultés. La mesure est faite à la pipette suivant les précautions que nous avons déjà signalées et la fiole jaugée remplie à l'aide d'une pipette à boule stérile. Mais il faut mentionner le cas des solutions visqueuses.

Celles-ci ne peuvent être mesurées à la pipette sans crainte d'une erreur très importante par suite de leur adhérence le long des parois et c'est ici que l'objection que nous faisions précédemment au sujet des dilutions en série, prend toute sa valeur :

1°) Le film qui reste sur la paroi interne de la pipette et dont l'épaisseur est fonction de la viscosité du liquide et de sa vitesse d'écoulement est la cause d'une erreur par défaut sur le volume mesuré, erreur qui peut être importante.

2°) Si les dilutions sont faites en séries en passant d'un tube à l'autre, on transporte la solution mère concentrée dans les dilutions plus faibles, le taux théorique de dilution n'est donc pas exact. Cette seconde erreur peut être évitée en changeant de pipette à chaque dilution. Mais l'erreur de mesure initiale demeure.

Il est donc indispensable d'opérer par pesée comme dans le cas des produits secs et d'évaluer l'activité au mg de liqueur ou d'utiliser des pipettes sans mouillage.

3°) REACTION PROPREMENT DITE.-

Après avoir préparé la dilution à 0,3 unité par cm3, on effectue la réaction proprement dite; on commence par disposer sur un porte-tubes les tubes de la réaction en s'assurant qu'ils ne présentent absolument aucun trouble ni aucun dépôt. Il ne faut pas perdre de vue que la lecture du titrage se fait par appréciation à l'oeil nu d'une turbidité et que le bouillon doit être initialement rigoureusement optiquement vide.

Puis, on répartit cette dilution à la pipette de 1cm3 utilisée en pipette 2 traits comme nous l'avons déjà indiqué.

Dans le cas d'un titrage d'orientation, cette répartition se fait suivant la gamme 2, et dans le cas d'un titrage de précision suivant la gamme 3 pour titrages de routine, en réservant la gamme I très serrée aux titrages de standards.

Accompagnant chaque série de titrages et dans les conditions identiques, sera effectué le titrage de la solution étalon à 0,3 unité par cm3, selon la gamme 3.

Nous aurons l'occasion de revenir sur ce point, mais signalons dès maintenant qu'il est nécessaire de faire sur chaque échantillon et sur l'étalon 5 titrages pour obtenir une précision convenable.

Aussitôt après la répartition des dilutions dans les tubes, ceux-ci sont placés dans un bac à eau glacée en attendant d'être ensemencés.

4°) ENSEMENCEMENT.-

Après répartition des dilutions convenables dans les tubes, la dernière opération à effectuer est l'ensemencement à l'aide du germe d'essai.

Il ne faut pas perdre de vue que la méthode des dilutions comporte, après l'incubation, l'appréciation à l'oeil nu d'une turbidité souvent très faible à la limite d'activité de la Pénicilline essayée. Aussi est-il nécessaire de faire l'ensemencement à l'aide d'une suspension microbienne suffisamment diluée pour ne pas présenter de trouble appréciable à l'oeil nu et ne pas former de dépôt. Cette suspension doit néanmoins contenir suffisamment de germes pour donner une culture abondante, après incubation, dans les tubes témoins sans Pénicilline.

Il fallait donc rechercher le nombre de germes optimum ainsi que l'âge convenable de la culture employée.

a) Nombre de germes à utiliser.-

Il était pratique de partir de cultures âgées de 20 à 24 heures. C'est donc avec celles-ci que nous avons commencé nos recherches.

Il convient de rappeler qu'il avait été primitivement décidé d'ensemencer chaque tube de titrage à l'aide de 0,5 cm3 d'une suspension microbienne, dont la richesse en germes restait à déterminer.

Des numérations systématiques de cultures de 20 heures sur le bouillon de titrage choisi, donnèrent une moyenne de 1 milliard de Staphylocoques par cm3.

Une telle culture diluée progressivement présente encore une turbidité appréciable à l'oeil nu à la dilution 1/500; à 1/1000 la turbidité est limite ou sublimite. Au-delà elle n'est plus apparente.

Nous avons donc essayé l'ensemencement de chaque tube à l'aide de 0,5 cm3 de culture de Staphylocoques diluée à 1/1000, ce qui correspond à une concentration moyenne initiale de 100.000 germes par cm3 dans le tube de titrage pour un volume moyen de 5 cm3. Cette dose de Staphylocoques donne une culture abondante après 20 heures d'incubation contenant 1 milliard de germes par cm3.

Mais le volume total de chacun des tubes de titrage n'est pas régulier et varie selon la zone de la gamme de dilution dans laquelle on se place. Ses limites extrêmes sont 6 cm3 et 4,5 cm3. La dilution initiale du germe à l'ensemencement varie donc de 83.000 par cm3 pour un volume total de 6 cm3 à 111.000 pour 4,5 cm3.

Il fallait rechercher l'influence possible de cette variation sur l'évolution de la culture de Staphylocoques.

Un certain nombre de tubes de bouillon, dont le volume variait de 4 cm3 à 5,5 cm3 par échelons de 0,5 cm3 ont été ensemencés par 0,5 cm3 de dilution à 1 pour 1000 d'une culture de Staphylocoques de 24 heures, et portés à l'étuve. D'heure en heure, à partir de la 15ème heure et jusqu'à la 24ème heure, 3 tubes de chaque catégorie sont retirés de l'étuve et immédiatement additionnés d'une goutte de formol officinal dilué à 1/10, et l'opacité de la culture mesurée à l'électrophotomètre de MEUNIER avec écran rouge. Le tableau n° 30 rend compte des mesures faites au photomètre.

Il apparaît tout d'abord que les densités optiques, à la mise à incuber, sont toutes égales quel que soit le volume.

Ensuite, on constate d'une part qu'elles ne varient sensiblement plus à partir de la 18ème heure de culture, et d'autre part qu'elles sont équivalentes quel que soit le volume mis en jeu, dès la 15ème heure de culture.

On pouvait donc conclure qu'il était possible d'ensemencer tous les tubes quel que soit leur volume à l'aide d'un même nombre de germes. Cette expérience nous donnait en même temps des indications intéressantes sur la durée d'incubation nécessaire aux titrages, sujet que nous aborderons au paragraphe suivant.

TABLEAU N° 30

Turbidité comparée de cultures de Staphylocoques pour des volumes variables et un ensemencement fixe

Volume total par tube	Turbidité initiale		Incubation 15 H		Incubation 16 H		Incubation 17 H		Incubation 18 H		Incubation 19 H	
4,5 cm³	16 16 16	16	35 35 40	38	47 47 48	47,3	45 45 45	45	63 59 59	60,3	54 57 54	55
5 cm³	16 16 16	16	37 37 40	38	50 49 50	49,6	45 45 46	45,3	61 58 62	60,3	57 60 55	57,3
5,5 cm³	16 16 16	16	40 36 38	38	50 48 48	48,6	44 44 44	44	58 54 55	55,6	62 62 48	57,3
6 cm³	16 16 16	16	44 44 38	42	43 43 43	43	48 41 44	44,3	57 50 57	54,6	54 55 58	55,6

Volume total par tube	Turbidité initiale		Incubation 20H		Incubation 21H		Incubation 22H		Incubation 23H		Incubation 24H	
4,5 cm³	16 16 16	16	55 50 56	53,6	60 60 68	62,6	57 66 60	61	65 60 62	63,2	59 61 62	60,6
5 cm³	16 16 16	16	57 55 56	56	62 60 58	60	56 56 65	59	59 58 58	58,3	60 65 58	61
5,5 cm³	16 16 16	16	50 52 52	51,3	63 56 58	59	55 59 60	68	60 62 57	59,3	57 61 62	60
6 cm³	16 16 16	16	57 54 54	55	54 58 57	56	55 59 55	56,9	58 63 55	58,6	62 65 55	60,6

b) Age du Staphylocoque.-

Pour étudier l'influence de l'âge du Staphylocoque d'ensemencement, on a ensemencé 1 goutte de culture dans une série de tubes de même volume que l'on a soumis à des temps d'incubation différents allant de 4 heures à 28 heures.

Des titrages ont été effectués avec chacune des cultures, diluées de façon à avoir le même nombre de germes d'ensemencement quel que soit leur âge.

A l'oeil nu, la culture de 4 heures paraît avoir une turbidité équivalente à celle des cultures de 12 heures ou plus diluées à 1/10, ou de la culture de 8 heures diluée à 1/8.

Cela est confirmé par la mesure des densités optiques au photomètre de MEUNIER (tableau n° 31).

Considérant comme approximativement équivalentes les cultures de 12 heures et au-dessus, on les a uniformément diluées à 1/1000 pour l'ensemencement des titrages.

TABLEAU N° 31

Densité optique d'une culture de Staphylocoque à différents âges

Age de la culture	*Densité optique*			*Moyenne*
Culture de 4 heures	*17,6*	*17,6*	*17,5*	*17,5*
- 8 -	*133*	*131*	*132*	*132*
- 12 -	*199*	*199*	*199*	*199*
- 16 -	*202*	*203*	*201*	*202*
- 20 -	*177*	*176*	*179*	*177*
- 24 -	*181*	*178*	*179*	*179*
- 28 -	*172*	*168*	*168*	*170*

La culture de 4 heures a été diluée à 1/100 et la culture de 8 heures à 1/800.

Les titrages ont été effectués dans les mêmes conditions sur une solution de Pénicilline standard.

Les taux d'inhibition, rapportés dans le tableau N° 32, ont été pratiquement équivalents quel que soit l'âge du germe.

Il apparaît donc que l'âge du germe mis en oeuvre est indifférent même s'il s'agit d'un germe en phase logarithmique de multiplication, c'est-à-dire de sensibilité maxima à la Pénicilline, la limite d'activité de l'antibiotique n'est pas modifiée. C'était là une précieuse indication qui rendait facile le choix de l'âge de la culture d'ensemencement.

Pour des raisons de commodité, nous avons utilisé régulièrement des cultures âgées de 20 heures.

Ces résultats ne doivent pas surprendre d'ailleurs, car si l'utilisation d'un germe en phase logarithmique donne une culture plus rapide où la phase de latence est supprimée, elle ne change pas l'intensité de la culture et la concentration maxima en germes n'est pas modifiée. Au contraire, dans les méthodes turbidimétriques rapides où la mesure de l'opacité de la cul-

TABLEAU N° 32

Dilution limite active d'une solution de Pénicilline observée en fonction de l'âge du germe d'ensemencement

	Dilution limite active d'une solution de Pénicilline			Moyenne
Staphylocoque de:				
- 4 heures	1/475	1/475	1/509	1/486
- 8 -	1/533	1/509	1/475	1/500
- 12 -	1/475	1/509	1/475	1/486
- 16 -	1/475	1/475	1/475	1/475
- 20 -	1/509	1/475	1/475	1/486
- 24 -	1/475	1/509	1/509	1/497
- 28 -	1/446	1/475	1/475	1/465

ture est faite avant que soit atteinte la saturation en germes, l'âge du germe ensemencé est de première importance.

5°) LECTURE DES RESULTATS.-

La lecture des résultats consiste dans l'appréciation de la plus grande dilution du produit en expérience (et de la solution standard titrée simultanément) inhibant totalement la pousse du Staphylocoque après incubation.

La question qui se pose alors est celle de la durée convenable d'incubation.

a) Durée d'incubation.-

Comme on l'a vu précédemment (tableaux N° 30 et 31), le germe ne se multiplie plus de façon appréciable après la 18ème heure d'incubation; la Pénicilline qui n'agit que sur les germes en cours de reproduction a donc terminé son action. Il n'est donc pas nécessaire de poursuivre au-delà le séjour des titrages à l'étuve si l'on ne veut pas voir apparaître des phénomènes secondaires irréguliers de pousse de germes ayant résisté à l'action de la Pénicilline.

Nous avons donc choisi la durée moyenne de 20 heures à 37° comme temps d'incubation, mais néanmoins, nous avons fait quelques essais de lecture tardive, au-delà de 24 heures.

Aucune conclusion n'a pu en être tirée, en raison de l'irrégularité générale des résultats, quand l'étuvage atteint 30 heures et plus. Les phénomènes de pousse secondaire ne se produisent pas de la même façon, selon qu'il s'agit de produits purs ou de liqueurs de culture, et ils sont particulièrement irréguliers pour les liqueurs de cultures. Les lectures tardives faites pour les solutions de Pénicilline pure présentent

un peu moins de variations par rapport à la lecture normale que celle des liqueurs de culture.

Cependant, on ne peut attacher aucune valeur à de tels résultats, en raison de leur inconstance.

b) Mises en évidence du tube limite.-

Il faut chercher le dernier tube qui ne présente à l'oeil nu aucune trace de culture. Chaque tube d'un titrage sera agité d'un coup sec, et regardé en même temps, et le tube limite choisi sera celui qui ne montrera même pas une légère spirale partant du fond du tube à l'agitation. C'est pourquoi, il est de première importance de disposer d'un bouillon de culture optiquement vide à l'origine. Cette façon d'opérer, apparemment délicate, devient très aisée avec un peu d'entraînement. Cependant, nous avons essayé de la simplifier et de faciliter la mise en évidence de la culture, à l'aide d'un indicateur coloré.

Le bouillon de culture est à l'origine au pH 7,3. Dès qu'il y a multiplication d'un germe et assimilation des constituants du milieu nutritif, il y a production d'acides et le pH baisse. De 7,2 à 7,3 qu'il était à l'origine, un bouillon présentant une légère culture pouvant être empiriquement marquée + possède un pH de 6,3 à 6,5 et un bouillon de culture très fournie que l'on marquera +++, un pH de 5,8 à 6,0.

Nous avons essayé d'ajouter, dans chaque tube, au moment de la lecture 1 goutte d'un indicateur de pH dont la zône de virage est située entre 6 et 7.

On a ainsi expérimenté les deux indicateurs suivants:

- Bromothymol bleu ..... zône sensible 6,1 à 7,7
- Bromocrésol pourpre .. " 5,4 à 7,0

La lecture des titrages était faite d'abord à l'oeil nu et ensuite après addition du colorant choisi. Dans aucun cas, le colorant ne s'est montré plus sensible que l'oeil, et le seuil apprécié des deux manières a toujours été le même, quel que soit le colorant envisagé.

6°) CALCUL DES RESULTATS.-

Il s'agit en dernier lieu de traduire en nombre d'unités de Pénicilline le taux de dilution observé.

Appelons :

v - le volume de solution étalon dilué à 0,3 U/cm3 introduit dans le tube E (tube limite d'activité de la solution étalon);

V - le volume total de milieu contenu dans ce tube;

v'- le volume de solution à titrer diluée à 0,3 U/cm3 présumée introduit dans le tube T (tube limite d'activité de la solution inconnue);

V' - le volume total de milieu contenu dans ce tube;

d - la dilution effectuée pour amener l'échantillon à 0,3 unité présumée par cm3;

X - l'activité par cm3 de l'échantillon à titrer dilué.

Par définition, il y a la même quantité de Pénicilline dans le tube limite de la série étalon E et dans celui de la série de titrage T.

On a donc : $0,3 \times \frac{v}{V} = X \times \frac{v'}{V'}$,

On en tire : $X = 0,3 \times \frac{v}{v'} \times \frac{V'}{V}$.

Comme l'échantillon a subi une dilution d, le titre cherché sera :

Titre : $0,3 \times \frac{v}{v'} \times \frac{V'}{V} \times d$, or $0,3 \times d = h$.

hypothèse émise pour faire la dilution. On a donc en définitive :

Titre : $\frac{v}{v'} \times \frac{V'}{V} \times h$

Exemple (tableau n° 33).-

Soit une dilution de Pénicilline à titrer, supposée contenir 90 unités par cm3 (hypothèse). Pour obtenir une concentration approchée à 0,3 Unité par cm3, elle sera diluée à 1/300 (90/0,3 = 300).

On fait 3 séries étalon et 3 séries de titrage pour cette solution et à la lecture on obtient les résultats suivants (voir tableau n° 33) :

(++ = croissance abondante : + = croissance nette, présence d'une spirale à l'agitation; - = absence de développement).

On a donc les valeurs suivantes :

pour v : va = 1 vb = 0,9 vc = 1 moyenne v = 0,96
pour V : Va = 5,5 Vb = 5,4 Vc = 5,5 " V = 5,46

pour v' : v'a=0,75 v'b = 0,7 v'c = 0,8 " v' = 0,75
pour V' : V'a=5,25 V'b = 5,2 V'c = 5,3 " V' = 5,25

Le titre recherché sera :

$$T = \frac{v}{v'} \times \frac{V'}{V} \times h = \frac{0,96}{0,75} \times \frac{5,25}{5,46} \times 90 = 110 \text{ Unites par } cm^3.$$

TABLEAU N° 33

Exemple de titrage

Tube N°	Volume de dilution en cm³	Volume total par tube	Série étalon			Série titrage		
			a	b	c	a	b	c
1	1,5	6	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
2	1,25	5,75	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
3	1,1	5,6	+	+	+	+ +	+ +	+ +
4	1	5,5	−	+	−	+ +	+ +	+ +
5	0,9	5,4	−	−	−	+	+	−
6	0,8	5,3	−	−	−	−	+	−
7	0,75	5,25	−	−	−	−	−	−
8	0,7	5,2	−	−	−	−	−	−
9	0,65	5,15	−	−	−	−	−	−
10	0,6	5,1	−	−	−	−	−	−
11	0,55	5,05	−	−	−	−	−	−
12	0,5	5	−	−	−	−	−	−

La technique qui vient d'être étudiée, conduit donc au protocole expérimental qui a été proposé sous la forme suivante au Codex français :

1°) Préparez le milieu de culture suivant (milieu I) :

- Peptone bactériologique Uclaf n° 13 .... 20 g.
- Chlorure de sodium officinal ..... 5 g.
- Glucose officinal ..... 2 g.
- Eau distillée q.s.p. 1000 cm3

Ajustez à pH 7,4 - 7,5 au moyen de lessive de soude au 1/10, portez à l'autoclave 30 minutes à 120° et filtrez bouillant sur filtre dur. Répartissez, en tubes stérilisés au four Pasteur, à la burette graduée ou au rhéomètre, à raison de 4,3 cm3 par tube (pour tenir compte de l'évaporation à la stérilisation). Stérilisez 20 minutes à 115° C.

Après stérilisation, le bouillon doit être à pH 7, et chaque tube doit contenir 4 cm3 ± 0,1. Il est possible d'arriver à une précision supérieure en répartissant aseptiquement en tubes stériles, à raison de 4 cm3 exactement, le bouillon également stérile, en utilisant une pipette graduée ou un répartiteur automatique.

Préparez d'autre part la solution tampon suivante, pour la dilution de l'étalon et des échantillons à titrer :

- phosphate monopotassique cristallisé anhydre ..... 6,1 g.
- phosphate disodique cristallisé à 12 OH_2 . 7,7 g.
- eau distillée q.s.p. 1000 cm3

Terminez l'ajustement à pH 6,4 à l'aide d'acide phosphorique à 1/10.

Répartissez en ballons de un litre et stérilisez 45 minutes à 120° C.

2°) Préparez la solution étalon suivante :

Pesez exactement 60 milligrammes environ d'étalon de travail (dont l'activité a été déterminée par comparaison avec l'étalon international); dissolvez-les dans le tampon stérile, en fiole jaugée, de façon à avoir une solution mère titrant environ 1.000 unités par cm3; conservez cette solution en glacière à 0° + 5° C; elle pourra être utilisée six à sept jours sans perte appréciable d'activité. A partir de cette solution mère, préparez en fiole jaugée, une dilution titrant exactement 0,3 unité par cm3.

Dissolvez d'autre part aseptiquement, la Pénicilline à titrer dans la solution tampon stérile d'après son activité présumée (hypothèse), de façon à avoir une dilution dont l'activité avoisine 0,3 unité/cm3.

3°) Le germe test à utiliser est un Staphylococcus aureus, souche Oxford, qui est repiqué tous les mois, en stries, sur le milieu décrit plus haut, gélosé à 20 pour 1000, cultivé 24 heures à l'étuve à 37°C et conservé en glacière, en tubes capuchonnés à la cellophane. Repiquez chaque semaine sur bouillon, à partir d'un de ces tubes, en choisissant une colonie bien pigmentée. Cultivez 20 heures à 37°C et faites un second passage en bouillon, qui servira pour l'ensemencement des tubes de titrage. Pour cela, diluez au 1/1000 en bouillon, la culture avant de l'utiliser.

4°) Préparez des séries de 12 tubes contenant chacun 4 cm3 de bouillon stérile, une série servant pour l'étalon, l'autre pour le produit à titrer. A l'aide de pipettes de 1 cm3 à deux traits, graduées au 1/20 de cm3 stérilisées au four Pasteur, répartissez aseptiquement la solution étalon dans la première série de tubes, la solution du produit à titrer dans l'autre série en changeant de pipette pour chaque série (suivant le tableau n° 28).

TABLEAU N° 28 (rappel)

Tube n°	Volume de dilution en cm3: v	Volume total par tube: V
1	1,5	6
2	1,25	5,75
3	1,1	5,6
4	1	5,5
5	0,9	5,4
6	0,8	5,3
7	0,75	5,25
8	0,7	5,2
9	0,65	5,15
10	0,6	5,1
11	0,55	5,05
12	0,5	5

Ajoutez ensuite aseptiquement dans chaque tube 0,5 cm3 de la dilution au 1/1000 de Staphylocoques. Placez côte à côte la série étalon et les séries titrages à l'étuve à 37°C pendant 20 heures. Faites alors la lecture de chaque série, en agitant les tubes d'un coup sec, les uns après les autres; dans certains tubes apparemment clairs, une culture légère ayant déjà sédimenté est mise en évidence lors de l'agitation par une spirale de germes s'élevant du fond. On considère comme tube limite du titrage le dernier tube ne présentant pas trace de culture.

5°) Calculez le titre de chaque échantillon en fonction de l'étalon de la même série de titrages de la manière suivante. Soient :

v - le volume de solution étalon contenu dans le tube-limite de la série étalon,

V - le volume total de ce tube,

v' - le volume de solution à titrer contenu dans le tube-limite de la série titrage,

V' - le volume total de ce tube,

d - la dilution effectuée pour amener l'échantillon à 0,3 unité/cm3 présumée.

L'activité X de l'échantillon sera :

$$X = 0{,}3 \times \frac{v}{v'} \times \frac{V'}{V} \times d \quad ;$$

comme 0,3 x d = h, hypothèse émise pour faire la dilution on a :

$$X = \frac{v}{v'} \times \frac{V'}{V} \times h \ .$$

La concentration à 0,3 unité/cm3 pour l'étalon a été choisie parce que, avec le milieu et dans les conditions de titrage indiquées plus haut, le tube limite de la série étalon se situe sensiblement au milieu de la gamme de remplissage indiquée.

Au cas où le tube-limite se trouverait trop décalé, ou même hors de cette gamme, modifiez la concentration de la dilution de l'étalon et celle des échantillons à titrer, de façon à retrouver la limite dans la zone moyenne de la gamme.

C - VALEUR DE LA METHODE.-

Dans une mesure, on peut considérer d'une part les erreurs systématiques qui sont dûes à une insuffisance de l'appareillage ou de la méthode, et d'autre part, les erreurs accidentelles dûes à de nombreuses petites causes agissant soit dans un sens, soit dans l'autre, comme si elles étaient dûes au hasard.

Enumérons brièvement les erreurs systématiques qui peuvent intervenir dans la technique de titrage par dilution que nous avons exposée, et voyons dans quelle mesure nous y avons déjà remédié :

a) qualité intrinsèque du produit titré : c'est l'erreur d'adhérence sur la paroi interne des pipettes, importante dans le cas des produits résineux.

Nous avons vu que dans ce cas il fallait opérer par pesée pour diluer le produit.

b) Volume de bouillon dans les tubes : la régularité dans le remplissage des tubes de bouillon a été obtenue par sa répartition stérile à l'aide d'un appareil jaugeur de verre de volume fixe ajusté à $\pm$ 0,1 cm3 pour 4 cm3 soit $\pm$ 2,5 pour 100. La répartition stérile élimine l'erreur dûe au changement de volume à l'autoclavage.

c) Qualité de verre des tubes : les tubes de verre Pyrex ne cèdent aucune alcalinité au liquide qu'ils contiennent.

d) Erreur de pipettes : l'emploi de pipettes longues à deux traits graduées en 1/20 cm3 et systématiquement contrôlées, réduit cette erreur au minimum. Nous rappelons que toute pipette donnant une erreur de $\pm$ 3 pour 100 est éliminée.

e) Incubation : le chauffage quelquefois inconstant des étuves à air peut être la cause d'irrégularités dans les cultures. L'incubation dans un bain-marie à grande capacité calorifique supprime ce risque et permet de plus d'atteindre plus rapidement l'équilibre de température dans les tubes à expérience.

f) Volume total de liquide dans chaque tube : il varie d'un tube à l'autre, mais comme nous l'avons déjà prouvé, cette variation est sans importance sur la culture du Staphylocoque dans les conditions expérimentales où l'on se trouve.

g) Lecture du titrage : c'est ici que subsiste encore la cause d'erreur la plus importante. L'approximation du seuil de turbidité est délicate, et nous avons vu que l'essai d'emploi de colorants divers pour faciliter sa mise en évidence, n'a pas donné de meilleure évaluation que l'observation directe.

Ces erreurs systématiques, nous les avons donc réduites au minimum par l'utilisation d'une méthode expérimentale rigoureuse et d'un appareillage soigneusement contrôlé. Toujours est-il que cette partie de l'erreur restera dans le même sens, et pourra être négligée grâce à l'emploi d'un standard dans les mêmes conditions expérimentales que l'essai. Mais pour connaître la valeur exacte de la technique établie, il était encore nécessaire d'étudier :

- sa marge d'application,
- sa reproductibilité,
- sa précision.

1°) MARGE D'APPLICATION DE LA METHODE.-

Comme nous l'avons dit, c'est expérimentalement que nous avons déterminé le taux moyen d'inhibition de l'étalon dans les conditions de travail (bouillon de culture, germe) où nous opérions.

La solution standard à 0,3 unité par cm3 inhibe à 1/7 environ, dilution que nous avons prise pour centre de la gamme (tube n° 19 de la gamme I, ou tube n° 7 de la gamme III).

Si l'on se reporte à la gamme III, on voit que pour une solution titrant exactement 0,3 U/cm3, l'inhibition peut se faire entre 0,03 U/cm3 (tube n° 12) et 0,075 U/cm3 (tube n° 1) dans le tube à expérience, c'est-à-dire pour des concentrations en Pénicilline variant de 1 à 2,5.

Dans la pratique, on dilue le produit à titrer d'après son titre présumé pour que l'inhibition se fasse aux environs du tube n° 7 (soit 0,0428 U/cm3) comme dans le titrage du Standard.

Ainsi une solution présumée à 0,3 U/cm3 (hypothèse 100 U/cm3 par exemple) pourra en réalité inhiber aussi bien à la dilution 1/4 (tube n° 1 soit 0,075 U/cm3) qu'à la dilution 1/9,1 (tube n° 11 soit 0,0326 U/cm3), ce qui correspondra aux titres suivants, si l'étalon à 0,3 U/cm3 inhibe à 1/7 (tube n° 7).

Etalon	Inhibition de la solution inconnue au tube n° I	Inhibition de la solution inconnue au tube n° II
$V = 0,75$	$V'_1 = 1,5$	$V'_2 = 0,55$
$V = 5,250$	$V'_1 = 6$	$V'_2 = 5,05$
	$\frac{0,75}{1,5} \times \frac{6}{5,25} \times 100$	$\frac{0,75}{0,55} \times \frac{5,05}{5,25} \times 100$
Titre =	57 U/cm^3 ou	132 U/cm^3

Comme il est nécessaire de faire 5 déterminations par échantillon, on fera chacune d'elles avec une hypothèse différente, ce qui élargira encore la marge d'application.

Si le tube limite inhibant du standard se trouve déplacé, la marge d'application de la gamme se déplacera également. Ainsi dans l'exemple choisi, si l'inhibition du standard se fait au tube n° 3 ou au tube n° 10, le calcul donne comme titres extrêmes possibles pour une solution d'hypothèse 100 U/cm3.

Inhibition Etalon	Inhibition de la solution inconnue au tube n° I	Inhibition de la solution inconnue au tube n° II
Tube n° 3	Titre = 78 U/cm3	Titre = 180 U/cm3
Tube n° 10	Titre = 47 U/cm3	Titre = 92 U/cm3

On est donc en dehors de l'hypothèse dans le deuxième cas.

Lorsque les conditions expérimentales restent les mêmes, il y a très peu de variation dans le tube limite (inhibant du standard (tubes n° 6, 7 ou 8).

C'est pourquoi il est absolument nécessaire, pour conserver à la méthode sa précision et malgré l'usage d'un standard, de définir avec exactitude un protocole opératoire optimum et de s'y conformer rigoureusement.

2°) REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE.-

Il s'agit ici de s'assurer de la régularité et de l'homogénéité des titres obtenus dans tous les cas possibles.

On va donc rechercher l'écart entre des titrages effectués dans les conditions expérimentales optima, quand la dilution de travail ou l'expérimentateur varient.

On étudiera les cas suivants :

- le titrage est fait plusieurs fois et observé par un seul expérimentateur travaillant avec une seule dilution,
- le titrage est fait en plusieurs exemplaires par un expérimentateur et observé par plusieurs personnes, indépendamment les unes des autres,
- le titrage est fait en plusieurs exemplaires, chacun d'eux correspondant à une dilution de travail différente, par un seul expérimentateur,
- le titrage est fait en plusieurs exemplaires par plusieurs expérimentateurs employant tous la même dilution de travail,
- le titrage est fait en plusieurs exemplaires par plusieurs expérimentateurs travaillant chacun avec leurs propres dilutions.

Dans tous les cas, le taux d'inhibition du standard sera déterminé par chacun des expérimentateurs.

Si les résultats obtenus sont homogènes, on sera ainsi assuré de la fidélité de la technique :

a) 1 dilution de travail - 1 seul opérateur.

Dans ce premier cas, deux solutions de Pénicilline ont été titrées après dilution convenable par une seule personne qui a également observé le résultat après incubation. Les écarts entre les divers titrages indiquent donc la précision de la technique, lorsque le facteur personnel de l'expérimentateur reste constant (tableau n° 34).

TABLEAU N° 34

Reproductibilité de la méthode a)

	Titre trouvé en U/cm³	Moyenne en U/cm³	Ecarts p. 100 sur la moyenne	Ecarts p. 100 sur les extrêmes
Solution A	8,5		- 4,4	
	8,5		+ 6,7	
	8,5	8,9	- 4,4	11,2
	8,5		- 4,4	
	8,5		+ 6,7	
Solution B	93		- 2,1	
	93		- 2,1	
	97	95,1	+ 2,0	6,3
	98		+ 3,0	
	98		+ 3,0	
	92		- 3,25	

Les écarts sur la moyenne dépassent donc rarement 5 pour 100.

b) 1 dilution de travail - 1 seul opérateur pour les titrages - 2 opérateurs pour la lecture des résultats.

Dans le deuxième cas intervient l'interprétation personnelle du titrage. L'observation de celui-ci dépend principalement de l'acuité visuelle de l'opérateur (tableau n° 35)

- moyenne générale = 9,05
- écarts maxima sur cette moyenne = + 10,5 pour 100 (titre=10)
  = - 6,0 pour 100 (titre=8,5)
- écarts des moyennes de chaque opérateur ..... = + 2,7 pour 100 (opérateur 1)
  = - 2,7 pour 100 (opérateur 2)

TABLEAU N° 35

Reproductibilité de la méthode b)

Titre en U/cm³ Opérateur I	Moyenne en U/cm³	Ecart pour 100 sur la moyenne	Ecart pour 100 entre les extrêmes	Titre en U/cm³ Opérateur II	Moyenne en U/cm³	Ecart pour 100 sur la moyenne	Ecart pour 100 entre les extrêmes
10		+ 7,5		8,5		- 3,4	
10		+ 7,5		9		+ 2,2	
9	9,3	- 3,2	16	9	8,8	+ 2,2	5,6
9		- 3,2		9		+ 2,2	
8,5		- 8,6		8,5		- 3,4	

L'interprétation individuelle du titrage n'entraîne donc pas une erreur importante, puisqu'il y a environ 5 pour 100 d'écart entre les moyennes des lectures de chaque opérateur, ce qui ne dépasse pas les écarts observés entre les diverses lectures d'un seul opérateur.

c) 4 dilutions de travail - 1 seul opérateur.-

Dans le cas présent, on supprime la variation possible dûe à l'interprétation individuelle, mais on prépare pour une même solution à doser plusieurs dilutions de travail (tableau n° 36); comme nous l'avons vu, la préparation de la dilution de travail demande un soin tout particulier, la moindre erreur de mesure entraînant des variations de titre importantes, surtout quand il s'agit de solutions très concentrées.

Ces résultats confirment les précédents, à savoir tout d'abord que pour un même expérimentateur et pour une même dilution l'écart entre les deux titrages n'excède pas 0,5 uni-

té, ce qui correspondrait dans le cas présent à 1 tube, sauf dans un seul cas où l'écart a été de 1 unité. De même entre des dilutions différentes.

On peut également faire dès maintenant la remarque sur laquelle nous reviendrons ultérieurement, qu'une série de 3 titrages donne une bonne exactitude, puisque l'écart de chaque moyenne sur la moyenne générale reste très petit (± 1,88 pour 100 au maximum).

TABLEAU N° 36

Reproductibilité de la méthode c)

	Titre en unités par cm³	Moyenne pour chaque dilution	Moyenne générale	Écarts pour 100 sur la moyenne générale	Écarts pour 100 de chaque m. sur la moyenne générale
Dilution A	13	13,16	13,25	− 1,88	− 0,67
	13			− 1,88	
	13,5			+ 1,88	
Dilution B	13,5	13,33		+ 1,88	+ 0,60
	13			− 1,88	
	13,5			+ 1,88	
Dilution C	13,5	13,5		+ 1,88	+ 1,88
	13,5			+ 1,88	
	13,5			+ 1,88	
Dilution D	13,5	13		+ 1,88	− 1,88
	12,5			− 5,66	
	13			− 1,88	

d) 1 seule dilution de travail titrée 5 fois par 2 opérateurs.

On recherche ici l'importance du coefficient personnel, non seulement dans la lecture des résultats comme cela a été déjà fait, mais dans le titrage lui-même; les deux opérateurs utilisent chacun leur pipette pour répartir une même dilution dans les tubes de la réaction. Chaque opérateur fait la lecture de ses propres tirages (tableau N° 37).

- Moyenne générale : 11,1
- Ecarts maxima sur cette moyenne = + 3,6 pour 100 (titre 11,5)
  = − 0,9 pour 100 (titre 11)
- Ecarts des moyennes de chaque opérateur . ..... = − 0,9 pour 100 (opérat. 2)
  = + 0,9 pour 100 (opérat. 1)

Les deux opérateurs qui titrent une même solution n'ont donc pratiquement pas de différence entre leurs résultats.

TABLEAU N° 37

Reproductibilité de la méthode d)

Opérateur I				Opérateur II			
Titres en U/cm³	Moyenne en U/cm³	Écarts p/100 sur la moyne	Écarts p/100 entre les extrêmes	Titres en U/cm³	Moyenne en U/cm³	Écarts p/100 sur la moyne	Écarts p/100 entre les extrêmes
11	11,2	-1,78	4,45	11	11	-	-
11		-1,78		11			
11		-1,78		11			
11,5		+2,67		11			
11,5		+2,67		11			

e) Titrage d'une solution par deux opérateurs, chacun d'eux travaillant avec ses dilutions personnelles.

Pour résumer l'ensemble des essais que nous venons d'exposer, nous donnons ici les résultats obtenus par deux opérateurs ayant titré une solution en 12 exemplaires à raison de 4 dilutions de travail différentes, titrée chacune 3 fois (tableau N° 38).

Cet ensemble d'expériences poursuivies systématiquement en réalisant les principales combinaisons possibles faisant varier en même temps ou séparément les expérimentateurs et les dilutions de travail, nous garantit la fidélité et la précision de la technique utilisée. Il ressort, en effet, de ces résultats, que les écarts moyens sont toujours inférieurs à 10 pour 100 et situés le plus souvent entre 2 et 5 pour 100.

On peut dire que pour un même expérimentateur et pour une même dilution de travail, l'écart entre deux titrages n'excède pas 1 tube; de même pour un même expérimentateur et pour des dilutions différentes.

Pour deux expérimentateurs différents travaillant chacun avec 4 dilutions différentes l'écart extrême observé a été de deux tubes dans un seul cas, ce qui correspondrait à une différence de - 5,8 pour 100 sur la moyenne.

Pour tous les autres résultats l'écart sur la moyenne a été compris entre - 2 et + 1,7 pour 100.

Quand on se place dans des conditions expérimentales optima : remplissage aseptique du bouillon, utilisation de pipettes à deux traits contrôlées et bien dégraissées, incubation au bain-marie, on peut affirmer qu'il n'y a pas d'écarts incohé-

rents entre différents titrages d'une solution, que le facteur personnel est sans influence et que la précision obtenue est aisément 5 pour 100.

TABLEAU N° 38

Reproductibilité de la méthode e)

Opérateur	Titres observés en U/cm³	Moyenne par dilution en U/cm³	Moyenne par opérat. en U/cm³	Moyenne générale en U/cm³	Écarts p/100 maxima
Opérateur I	13,5 13,5 13,5	13,5			+ 1,7
	13 13 13	13			- 2
			13,29		
	13,5 13,5 13,5	13,5			
	13 13,5 13	13,16		13,27	
Opérateur II	13 13 13,5	13,16			+ 1,7
	13,5 13 13,5	13,33			
			13,25		
	13,5 13,5 13,5	13,5			
	13,5 12,5 13	13			- 5,8

3°) PRECISION DE LA METHODE DES DILUTIONS.-

On vient de voir que la technique de titrage établie permet d'obtenir des résultats reproductibles à moins de 5 pour 100 près. En d'autres termes la technique est fidèle à moins de 5 pour 100. Cela ne signifie pas que la précision de la méthode soit 5 pour 100, car l'erreur systématique attachée à la technique dépend de la précision du matériel employé.

Il faut donc encore calculer la précision de la méthode, puis enfin quand on est en possession d'une série de résultats, calculer la valeur probable de celui-ci.

L'erreur probable peut être faible, et cependant l'approximation du résultat peu précise dans le cas où l'erreur constante dûe à la méthode employée est importante. Comme on l'a déjà fait remarquer l'erreur constante peut être négligée grâce à l'emploi d'un standard dans les mêmes conditions que l'expérience. Nous allons néanmoins en fixer la grandeur. Elle sera utile à connaître au cas où cette technique devrait être appliquée au titrage d'un antibiotique quelconque pour lequel il n'existerait pas encore de standard, et dont l'activité devrait être de ce fait exprimée en valeur absolue.

a) Erreur systématique.-

On ne peut connaître l'erreur absolue que l'on commet sur une mesure, aussi n'en exprime-t-on que la limite supérieure. Il est possible de calculer l'erreur maxima d'une mesure en établissant les erreurs partielles dont on fait la somme, ce qui suppose qu'elles jouent toutes dans le même sens, ce qui n'arrivera pratiquement jamais.

Dans la présente technique, il faut évaluer :

- le pourcentage d'erreur sur la mesure des volumes, variable pour chaque tube puisqu'il dépend du volume dans le tube,

- le pourcentage d'erreur sur la dilution du produit à titrer,

  - sur la mesure des volumes des tubes de la réaction,

- erreur sur la mesure du bouillon au jaugeur : 0,1 cm3,

- erreur sur le volume de dilution en bouillon distribué dans chaque tube : les répartitions sont faites à la pipette de 1 cm3 graduée en 1/20, à 2 traits; si l'on se reporte à la gamme 3 de titrage (tableau N° 28) on voit que du tube I au tube 3, il faut 2 coups de pipette pour répartir la dilution dans chaque tube. On peut admettre que l'erreur faite à chaque fois ne dépasse pas 0,025 cm3 :
  - soit du tube 1 à 3 = 0,025 x 2 = 0,050 cm3,
    et du tube 4 à 12 = 0,025 cm3.

- erreur sur le volume de suspension de Staphylocoques : on emploie la même pipette que précédemment, ce qui donne donc une erreur de 0,025 cm3.

L'erreur de volume totale est donc :

du tube 1 à 3 = 0,1 + 0,050 + 0,025 = 0,175 cm3 pour un volume total allant de 6 cm3 à 5,6 cm3,

ce qui correspond à une erreur de ± 2,91 à 3,1 pour 100.

du tube 4 à 12 : 0,1 + 0,025 + 0,025 = 0,150 cm3 pour un volume total théorique allant de 5,5 cm3 à 5 cm3,

ce qui correspond à une erreur de ± 2,72 à 3 pour 100.

Cette partie de l'erreur absolument constante, se retrouvera aussi bien dans les titrages d'étalons que dans ceux des produits inconnus et ne variera pas dans le temps. Elle est d'ailleurs faible puisque les valeurs de ± 2,7 à 3 pour 100 calculées représentent des maxima. Elle est donc pratiquement négligeable.

- sur la dilution du produit à titrer.-

Si l'on se reporte au tableau N° 29, on voit que les volumes de liqueur mesurés à la pipette varient de 0,5 cm3 à 0,95 cm3.

En admettant comme précédemment une erreur maxima de 0,025 cm3 par mesure, on a donc une erreur relative de :

$$\frac{0,025}{0,5} \quad \text{à} \quad \frac{0,025}{0,95}$$

soit ± 5 p/100 à ± 2,63 p/100 .

Il faut ajouter à ce pourcentage l'erreur portant sur la mesure dans la fiole jaugée. En réalité cette dernière est tout à fait négligeable, comme le montrent les chiffres du tableau N° 39, correspondant à la vérification de quelques-unes des fioles jaugées que nous utilisions :

TABLEAU N° 39

Précision des fioles jaugées

N° de la fiole	Volume théorique en cm³	Volume réel en cm³	Erreur pour 100
501	100	100,237	+ 0,23
502	100	100,110	+ 0,11
504	50	50,004	+ 0,008
505	50	49,9795	- 0,041
524	25	24,9965	- 0,014
536	10	10,0025	+ 0,025

Mais, comme précédemment, cette partie de l'erreur est également négligeable, puisqu'elle se retrouvera dans le titrage de toutes les solutions quel que soit leur titre, ainsi que dans le titrage des solutions standard.

b) Calcul du résultat probable, d'après une série de résultats.

Lorsqu'on se trouve en possession d'une série de résultats concernant le même échantillon, il faut calculer la valeur de la mesure cherchée.

Si l'on doit accorder la même confiance aux différentes mesures, et c'est précisément le cas, leur moyenne arithmé-

tique est la valeur la plus probable du résultat cherché.

Mais, faut-il établir la moyenne avec tous les résultats quels qu'ils soient ?

L'élimination d'un résultat quelconque ne peut être permise qu'à l'expérimentateur disposant d'un grand nombre de résultats pour un même essai : lui seul connaissant alors parfaitement sa technique et les résultats qu'elle provoque a la possibilité de discerner les mesures exceptionnelles à éliminer. Mais lorsque les essais portent sur un nombre restreint de titrages, ce qui est le cas le plus fréquent, la certitude du choix ne pourra pas être suffisante et une élimination intempestive risquerait de fausser complètement le sens du dosage.

Cependant, d'après LIND van WIJNGAARDEN, on peut éliminer les déterminations dont l'écart pour 100 par rapport à la valeur moyenne dépasse le produit de l'erreur quadratique moyenne individuelle eq par un facteur a, dépendant du nombre n des déterminations individuelles.

Mais J. REGNIER, S. LAMBIN et S. SZOLLOSI (182) font remarquer que ce qui était possible à LIND van WIJNGAARDEN opérant sur de très nombreuses déterminations, devient très discutable quand il s'agit d'un petit nombre d'essais et conseillent de conserver tous les résultats expérimentaux.

Nous avons donc pris pour valeur d'une série de résultats leur moyenne arithmétique sans élimination d'aucun d'entre eux.

Il nous fallait d'après nos résultats expérimentaux calculer la précision de la méthode.

Pour connaître la précision mathématique d'une technique, il faut en possession d'une série de résultats calculer l'écart quadratique moyen sur une détermination individuelle de la série, qui représente la précision moyenne attachée à un résultat quelconque de la série et permet d'apprécier l'importance de la dispersion des valeurs observées, puis l'erreur à craindre sur la moyenne qui représente la physionomie de la série et la précision qu'on peut attendre si l'on prend comme résultat final la moyenne arithmétique des résultats expérimentaux.

Ce calcul répété sur plusieurs séries permettra de définir le pourcentage moyen de précision de la méthode.

Connaissant la précision de la technique, on calculera ensuite le nombre de déterminations nécessaires pour l'obtenir.

1°) Ecart quadratique moyen - erreur à craindre sur la moyenne.

L'écart quadratique moyen sur une détermination individuelle appelé aussi l'écart type par certains : E. MORICE, M. TISSERAND et J. REBOUL (143) est donné par la formule :

$$eq = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$$ pour un petit nombre d'essais

où Σd^2 représente la somme des carrés des différences entre la valeur de la moyenne arithmétique et la valeur de chaque mesure, et n le nombre total de mesures.

Dans le cas d'observations nombreuses, on doit diviser par le nombre total d'observations.

L'erreur à craindre sur la moyenne ou écart individuel moyen de H. PENAU et H. SIMONNET (157) est exprimé par :

$$e_c = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$$

Sa connaissance permet de fixer les limites dans lesquelles se trouve située la valeur vraie cherchée.

Si l'on désigne par t l'écart réduit défini par $t = \frac{d}{e_c}$ on sait qu'il y a une probabilité 2 F (t) pour que la moyenne vraie soit située dans l'intervalle $\bar{v} \pm t \times e_c$.

Dans le cas d'une répartition normale suivant la loi de Laplace-Gauss, c'est-à-dire dans le cas où le nombre de déterminations est élevé (supérieur à 30) on sait que la probabilité d'un écart supérieur en valeur absolue à $t \times e_c$ est de :

50 %	si	t	est égal à 0,67
68 %	si	"	" 1
95 %	si	"	" 1,96
99,7 %		"	" 3

Cependant dans la majorité des cas, et notamment dans les titrages de routine, nous n'aurons pas la possibilité d'effectuer un nombre élevé de titrages. Dans ces conditions, il n'est pas possible de considérer que la variable t est normalement distribuée, et au lieu de prendre pour valeur de t celle indiquée par la table de distribution normale, il est nécessaire d'utiliser la table de probabilité totale de FISCHER et STUDENT, dans laquelle la valeur de t augmente quand le nombre d'essais diminue. Si l'on admet par exemple un seuil de probabilité P = 0,05 (c'est-à-dire qu'il n'y aura pas plus de 5 pour 100 de chiffres dûs au hasard de l'échantillonnage), on aura les valeurs suivantes de t, pour un nombre de degrés de liberté n' = n - 1.

n'	2	4	6	8	10	16	20	30	*Table normale*
t	4	2,78	2,45	2,31	2,23	2,13	2,09	2,04	1,96

Le tableau N° 40 donne l'étude statistique de 6 séries de titrages, avec P = 0,05.

De l'examen de ce tableau il ressort :

1°) que l'on peut admettre comme écart quadratique moyen d'une détermination individuelle la valeur de 7 pour 100, pour des séries d'au moins 10 mesures,

2°) qu'avec 10 à 15 déterminations, on a une précision de 3,6 à 5,3 pour 100 sur leur moyenne pour une probabilité de 95

TABLEAU N° 40

Précision de la Méthode

Échantillon	Volume de dilution à 0,3 U. par cm³ v	Moyenne arithmétique	Écart individuel d	Écart individuel d²	Σ d²	$e_q = \pm\sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$	$e_c = \pm\sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$	Précision du résultat final $\bar{y} \pm t.e_c$	Volume V correspondant	Moyenne arithmétique $\bar{V}$
Série étalon n = 12	0,825 0,900 1,000 0,875 0,875 0,825 0,900 0,900 0,950 0,950 0,950 0,900	0,900	- 0,075 0 + 0,100 - 0,025 - 0,025 - 0,075 0 0 + 0,050 + 0,050 + 0,050 0	0,005625 0 0,010000 0,000625 0,000625 0,005625 0 0 0,002500 0,002500 0,002500 0	0,030	$e_q = \pm\sqrt{\frac{0,03}{11}}$ $= \pm 0,052$ soit : ± 5,8 %	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,03}{132}}$ $= \pm 0,0146$	Pour n = 12 t = 2,23 0,900 ± 2,23 x 0,0146 = 0,900 ± 0,0326 soit: 0,900 ± 3,6 %	5,325 5,400 5,500 5,375 5,375 5,325 5,400 5,400 5,450 5,450 5,450 5,400	5,400
S.A. hypothèse 300 U/cm³ n = 12	0,750 0,725 0,850 0,675 0,700 0,675 0,700 0,725 0,675 0,675 0,700 0,675	0,710	+ 0,040 + 0,015 + 0,140 - 0,035 - 0,010 - 0,035 - 0,010 + 0,015 - 0,035 - 0,035 - 0,010 - 0,035	0,001600 0,000225 0,019600 0,001225 0,000100 0,001225 0,000100 0,000225 0,001225 0,001225 0,000100 0,001225	0,028075	$e_q = \pm\sqrt{\frac{0,028075}{11}}$ $= \pm 0,050$ soit : ± 7,1 %	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,028075}{132}}$ $= \pm 0,0145$	Pour n = 12 t = 2,23 0,710 ± 2,23 x 0,0145 = 0,710 ± 0,0323 soit : 0,710 ± 4,55 %	5,250 5,225 5,350 5,175 5,200 5,175 5,200 5,225 5,175 5,175 5,200 5,175	5,210
S.G. n = 10	0,850 0,900 0,900 0,800 0,825 0,775 0,725 0,850 0,775 0,750	0,815	+ 0,035 + 0,085 + 0,085 - 0,015 + 0,010 - 0,040 - 0,090 + 0,035 - 0,040 - 0,065	0,001225 0,007225 0,007225 0,000225 0,000100 0,001600 0,008100 0,001225 0,001600 0,004225	0,03275	$e_q = \pm\sqrt{\frac{0,03275}{9}}$ $= \pm 0,060$ soit : ± 7,9 %	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,03275}{90}}$ $= \pm 0,019$	Pour n = 10 t = 2,28 0,815 ± 2,28 x 0,019 = 0,815 ± 0,043 soit : 0,815 ± 5,3 %		

TABLEAU N° 40 (suite)

Échantillon	Volume de dilution à 0,3 U. p cm³ v	Moyenne arithmétique $\bar{v}$	Écart individuel d	d^2	Σd^2	$e_q = \pm\sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$	$e_c = \pm\sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$	Précision du résultat final $\bar{v} \pm t \cdot e_c$	Volume V correspondant	Moyenne arithmétique $\bar{V}$
S. N. n = 10	0,900 0,900 0,850 0,875 0,875 0,725 0,850 0,950 0,875 0,800	0,860	+ 0,040 + 0,040 − 0,010 + 0,015 + 0,015 − 0,135 − 0,015 + 0,090 + 0,015 − 0,060	0,0016 0,0016 0,0001 0,000225 0,000225 0,018225 0,000225 0,0081 0,000225 0,0036	0,034125	$e_q = \pm\sqrt{\frac{0,034125}{9}}$ soit : ± 7,2 %	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,034125}{90}}$ = ± 0,0195	Pour n = 10 t = 2,28 0,860 ± 2,28 x 0,0195 = 0,860 ± 0,0445 soit : 0,860 ± 5,2 %		
C. 7 n = 13	1,100 1,100 1,050 1,100 1,100 0,950 1,000 1,000 1,000 0,950 1,150 1,100 1,200	1,060	+ 0,040 + 0,040 − 0,010 + 0,040 + 0,040 − 0,010 − 0,060 − 0,060 − 0,060 − 0,010 + 0,090 + 0,040 + 0,140	0,0016 0,0016 0,0001 0,0016 0,0016 0,0001 0,0036 0,0036 0,0036 0,0001 0,0081 0,0016 0,0196	0,0468	$eq = \pm\sqrt{\frac{0,0468}{12}}$ = ± 0,0625 soit : ± 5,9 %	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,468}{156}}$ = ± 0,017	Pour n = 13 t = 2,2 1,060 ± 2,2 x 0,017 = 1,060 ± 0,0374 soit : 1,060 ± 3,63 %		
C. 10 n = 15	0,900 0,900 0,900 0,800 0,825 0,900 0,850 0,850 0,950 1,000 0,950 0,950 1,000 0,850 0,850	0,895	+ 0,005 + 0,005 + 0,005 − 0,095 − 0,070 + 0,005 − 0,045 − 0,045 + 0,055 + 0,105 + 0,055 + 0,055 + 0,105 − 0,045 − 0,095	0,000025 0,000025 0,000025 0,009025 0,004900 0,000025 0,002025 0,002025 0,003025 0,011025 0,003025 0,003025 0,011025 0,002025 0,009025	0,06025	$eq = \pm\sqrt{\frac{0,06025}{14}}$ = ± 0,065 soit : ± 7 %	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,06025}{210}}$ = ± 0,0169	Pour n = 15 t = 2,2 0,895 ± 2,2 x 0,0169 = 0,895 ± 0,0372 soit : 0,895 ± 4,15 %		

pour 100, c'est-à-dire que dans ce cas on n'a plus qu'une chance sur 20 de tomber sur une valeur expérimentale qui s'écarte en plus ou en moins de la valeur moyenne $\pm$ t.e_c.

Mais il ne faut pas oublier que l'on doit en réalité comparer 2 séries de mesures : la série étalon et la série inconnue.

Nous allons à titre d'exemple calculer les diverses valeurs possibles pour l'échantillon S.A. en fonction de l'étalon, pour lesquels nous avons porté sur le tableau n° 40 les valeurs correspondantes de V.

Pour la solution étalon, on a :

v = 0,900 $\pm$ 0,0326 cm3
V = 5,400 $\pm$ 0,0326

et pour la solution S.A. :

v' = 0,710 $\pm$ 0,0323 cm3
V' = 5,210 $\pm$ 0,0323

Les titres extrêmes possibles sont donc :

1°) avec v = 0,900 + 0,032 = 0,932 et V = 5,400 + 0,032 = 5,432

soit v'= 0,710 + 0,032 = 0,742 et V'= 5,210 + 0,032 = 5,242

et un titre : $T = \frac{v}{v'} \times \frac{V'}{V} \times h$

$= \frac{0,932}{0,742} \times \frac{5,242}{5,432} \times 300 = 364$ U/cm3

soit v'= 0,710 - 0,032 = 0,678 et V'= 5,210 - 0,032 = 5,178

et un titre :

$T = \frac{0,932}{0,678} \times \frac{5,178}{5,432} \times 300 = 392$ U/cm3

2°) avec v = 0,900 - 0,032 = 0,868 et V = 5,400 - 0,032 = 5,368

soit v'= 0,710 + 0,032 = 0,742 et V'= 5,210 + 0,032 = 5,242

et un titre :

$T = \frac{0,868}{0,742} \times \frac{5,242}{5,368} \times 300 = 343$ U/cm3

soit v'= 0,710 - 0,032 = 0,678 et V'= 5,210 - 0,032 = 5,178

et un titre :

$T = \frac{0,868}{0,678} \times \frac{5,178}{5,368} \times 300 = 370$ U/cm3

On peut donc affirmer que la solution S.A. titre entre 343 et 392 Unités par cm3, soit 367 $\pm$ 24 Unités par cm3, ou 367 Unités par cm3 $\pm$ 6,5 pour 100.

2°) Nombre de déterminations à effectuer par échantillon.-

Mais, dans la pratique courante industrielle, il ne sera généralement pas possible d'effectuer pour un même échantillon un nombre de titrages aussi important que dans l'exemple que nous venons d'étudier, qui concernait une solution d'une Pénicilline appelée à nous servir de standard de travail.

Il nous restait donc à rechercher le nombre d'essais à effectuer sur un même échantillon pour obtenir une précision convenable.

Nous avons titré la solution standard et une solution inconnue supposée à 200 Unités par cm3, d'une part en 3 exemplaires, et d'autre part en 5, et nous avons fait pour ces deux séries d'expériences, les mêmes calculs que dans le cas précédent (voir tableau n° 41).

On voit qu'en passant de 3 à 5 titrages pour un même échantillon, l'erreur probable sur leur moyenne diminue de 15 pour 100 à 7 pour 100.

Si l'on évalue les titres extrêmes possibles, comme dans le cas précédemment étudié, on obtient :

a) Avec 3 titrages pour l'étalon et l'échantillon à doser :

1°) Avec $v = 0,966 + 0,148 = 1,114$ et $V = 5,466+0,148=5,614$

soit $v' = 0,700 + 0,115 = 0,815$ et $V' = 5,200+0,115=5,315$

Titre $T = \frac{1,114}{0,815} \times \frac{5,315}{5,614} \times 200 =$ 260 U/cm3

soit $v' = 0,700 - 0,115 = 0,585$ et $V' = 5,200-0,115=5,085$

Titre $T = \frac{1,114}{0,585} \times \frac{5,085}{5,614} \times 200 =$ 346 U/cm3

2°) avec $v = 0,966 - 0,148 = 0,818$ et $V = 5,466-0,148=5,318$

soit $v' = 0,700 + 0,115 = 0,815$ et $V' = 5,200+0,115=5,315$

Titre $T = \frac{0,818}{0,815} \times \frac{5,315}{5,318} \times 200 =$ 201 U/cm3

soit $v' = 0,700 - 0,115 = 0,585$ et $V' = 5,200-0,115=5,085$

Titre $T = \frac{0,818}{0,585} \times \frac{5,085}{5,318} \times 200 =$ 266 U/cm3

b) Avec 5 titrages pour l'étalon et l'échantillon à doser :

1°) avec $v = 0,960 + 0,068 = 1,028$ et $V = 5,460+0,068=5,528$

soit $v' = 0,720 + 0,055 = 0,775$ et $V' = 5,220+0,055=5,275$

Titre $T = \frac{1,028}{0,775} \times \frac{5,275}{5,528} \times 200 =$ 254 U/cm3

soit v'= 0,720 - 0,055 = 0,665 et V'= 5,220-0,055=5,165

Titre T = $\frac{1,028}{0,665} \times \frac{5,165}{5,528} \times 200 = \underline{288 \text{ U/cm3}}$

2°) Avec v = 0,960 - 0,068 = 0,892 et V = 5,460-0,068=5,392

soit v'= 0,720 + 0,055 = 0,775 et V'= 5,220+0,055=5,275

Titre T = $\frac{0,892}{0,775} \times \frac{5,275}{5,392} \times 200 = \underline{225 \text{ U/cm3}}$

soit v'= 0,720 - 0,055 = 0,665 et V'= 5,220-0,055=5,165

Titre T = $\frac{0,892}{0,665} \times \frac{5,165}{5,392} \times 200 = \underline{257 \text{ U/cm3}}$

On a donc pour trois titrages de l'étalon et de la solution inconnue un titre pouvant aller de 200 à 346 Unités par cm3, soit 273 $\pm$ 73 Unités par cm3 ou 273 U/cm3 $\pm$ 27,7 %. Il s'agit là évidemment des limites extrêmes dans le cas où l'erreur attachée à l'étalon et l'erreur attachée à l'essai jouent dans le même sens.

Avec 5 titrages, on peut affirmer que le titre vrai est compris entre 225 et 288 Unités par cm3 soit 256 $\pm$ 31 Unités par cm3, ou 256 Unités par cm3 $\pm$ 12 pour 100.

En fixant à 5 le nombre de déterminations à effectuer par échantillon, on est assuré que la méthode des dilutions employée dans des conditions expérimentales convenables, donnera un résultat entaché d'une erreur d'environ 10 pour 100 au maximum.

Si le nombre de déterminations n'est que 3, l'erreur pourra atteindre 25 pour 100.

Mais il faut bien remarquer que ces pourcentages sont des maxima et non des moyennes.

On a pu voir en réalité en étudiant la reproductibilité de la méthode que l'erreur moyenne est toujours nettement inférieure à 10 pour 100 même en n'effectuant que 3 déterminations. Néanmoins, du point de vue statistique, il faudra 5 déterminations pour obtenir avec une probabilité de 95 pour 100 une précision de 90 pour 100.

TABLEAU N° 41

Recherche du nombre d'essais à effectuer par Echantillon

Échantillon	v	$\bar{v}$	Écart individuel d	Écart individuel d^2	Σd^2	$e_c = \pm\sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$	Précision $\bar{v} \pm t \times e_c$	Volume V correspondant	Moyenne arithmétique $\bar{V}$
Étalon $n=3$	1,0 1,0 0,900	0,966	+ 0,044 + 0,044 − 0,066	0,001936 0,001936 0,004356	0,008228	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,008228}{6}}$ $= \pm$ 0,037	Pour $n=3$ $t=4$ $0,966 \pm 4 \times 0,037$ $= 0,966 \pm 0,148$ $= 0,966 \pm 15,3\%$	5,500 5,500 5,400	5,466
Solution $n=3$	0,750 0,700 0,650	0,700	+ 0,050 − − 0,050	0,0025 − 0,0025	0,0050	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,005}{6}}$ $= \pm$ 0,0288	Pour $n=3$ $t=4$ $0,700 \pm 4 \times 0,0288$ $= 0,700 \pm 0,1152$ $= 0,700 \pm 16,5\%$	5,250 5,200 5,150	5,200
Étalon $n=5$	1,0 1,0 1,0 0,900 0,900	0,960	+ 0,040 + 0,040 + 0,040 − 0,060 − 0,060	0,0016 0,0016 0,0016 0,0036 0,0036	0,0120	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,012}{20}}$ $= \pm$ 0,0245	Pour $n=5$ $t=2,78$ $0,960 \pm 2,78 \times 0,0245$ $= 0,960 \pm 0,068$ $= 0,960 \pm 7,1\%$	5,500 5,500 5,500 5,400 5,400	5,460
Solution $n=5$	0,750 0,750 0,750 0,700 0,650	0,720	+ 0,030 + 0,030 + 0,030 − 0,020 − 0,070	0,0009 0,0009 0,0009 0,0004 0,0049	0,0080	$e_c = \pm\sqrt{\frac{0,008}{20}}$ $= \pm$ 0,02	Pour $n=5$ $t=2,78$ $0,720 \pm 2,78 \times 0,02$ $= 0,720 \pm 0,0556$ $= 0,720 \pm 7,6\%$	5,250 5,250 5,250 5,200 5,150	5,220

CONCLUSIONS

Arrivée au terme de cette étude, nous devons en tirer les principales conclusions :

I - L'examen systématique de toutes les méthodes proposées pour le titrage de la Pénicilline que nous avons pu réunir a orienté nos recherches vers les méthodes biologiques. En effet, aussi séduisantes que puissent paraître les méthodes physiques ou chimiques, elles ont l'inconvénient de ne pouvoir être utilisées que pour des produits purs, ou tout au moins partiellement purifiés. Dans l'état actuel des choses, elles ne peuvent supplanter les méthodes biologiques pour le titrage des produits de nature complexe. De plus, il ne faut pas perdre de vue que la Pénicilline est un agent antimicrobien; il est donc logique d'exprimer son activité par son action antimicrobienne, la seule de ses propriétés intéressant le clinicien qui la prescrira.

II - Parmi les méthodes biologiques, notre choix s'est porté sur la méthode de titrage par dilution pour plusieurs raisons :

1°) Elle est simple dans son principe et s'apparente étroitement aux méthodes classiques de la bactériologie et de la sérologie.

2°) Elle ne nécessite aucun matériel spécialisé, souvent coûteux, comme c'est le cas des deux autres méthodes les plus employées, la méthode de HEATLEY et la turbidimétrie. Elle peut être réalisée dans n'importe quel laboratoire de bactériologie avec le matériel de travail courant.

3°) Elle est d'application absolument générale et peut être utilisée pour le titrage de n'importe quelle substance antimicrobienne d'origine biologique ou chimique.

III - Nous avons cherché à mettre au point un protocole expérimental à la fois facile à réaliser, exact et valable dans tous les cas de titrages d'antiseptiques. C'est ainsi que nous avons étudié :

1°) Les soins à apporter dans le choix du matériel de titrage, son nettoyage et sa stérilisation :

a) les tubes à essai doivent être :

- en verre neutre,
- convenablement lavés et rincés,
- non goudronnés à la stérilisation;

b) les pipettes doivent être :

- soigneusement choisies et vérifiées en ce qui concerne leur graduation,

- dégraissées avant usage (d'où le nettoyage et la stérilisation que nous avons préconisés),

c) Les étuves doivent être vastes (portoirs bien séparés) ou mieux remplacées par des bain-marie.

2°) La préparation des milieux de culture. Le bouillon de culture doit être :

a) de composition constante (stock de matières premières),

b) stérilisé dans des conditions constantes (température, durée, nombre de stérilisations),

c) ajusté à un pH rigoureux - l'activité de la Pénicilline étant variable avec le pH comme nous l'avons prouvé.

3°) Le germe employé a toujours été le même, ce qui est nécessaire pour les titrages sans étalon de référence, mais ne l'est plus pour les titrages avec étalon.

4°) La gamme de dilution joue le rôle le plus important. Elle doit être à la fois sensible et étendue, deux caractéristiques incompatibles en apparence, puisque la sensibilité ne peut être obtenue qu'en rapprochant les dilutions successives, ce qui amène à un trop grand nombre de dilutions par titrage, si l'on veut aussi obtenir une gamme très étendue. La gamme que nous avons choisie constitue un compromis satisfaisant, puisque :

a) l'intervalle entre deux échelons n'est que de 0,002 à 0,006 unité,

b) la gamme s'étend de 0,03 à 0,07 Unité/cm3,

c) elle permet le titrage avec une précision de $\pm$ 7 pour 100, dans intervalle compris entre $\pm$ 50 pour 100 de l'hypothèse émise, comme nous l'avons montré, à la condition de suivre rigoureusement les règles que nous avons précisées pour la dilution des échantillons, la mesure des volumes et la lecture du seuil.

C'est pourquoi nous croyons pouvoir affirmer que la méthode des dilutions constitue une mesure exacte de l'activité de la Pénicilline au point de vue thérapeutique aussi bien que de la Pénicillinémie, les deux grands points intéressant le clinicien, lorsqu'elle est appliquée correctement. Enfin, c'est la seule qui semble applicable avec une exactitude suffisante, au début de l'étude de tout nouvel antibiotique, avant qu'on puisse disposer d'un étalon suffisamment pur et stable.

VU : *Le Président de la Thèse :*
M. M. JANOT

VU : *Le Doyen de la Faculté de Pharmacie :*
R. FABRE

VU et PERMIS D'IMPRIMER
Le Recteur de l'Académie de Paris :
J. SARRAILH

2ème Sujet :
Proposition donnée par la Faculté :

L'ACIDE FOLIQUE

BIBLIOGRAPHIE

1 - ABRAHAM (E.P.), CHAIN (E.), BAKER (W.), ROBINSON (R.).- Pénicillamin, characteristic degradation product of Penicillin Nature, 1943, 151,107.

2 - ABRAHAM (E.P.), CHAIN (E.), FLETCHER (C.M.), FLOREY (H.W.) GARDNER (A.D.), HEATLEY (N.G.), JENNINGS (M.A.).- Furthers observations on Penicillin, Lancet, 1941, 2.177-89.

3 - ALICINO (J.F.).- Iodometric method for the assay of Penicillin preparations - Ind. and Eng. Chem. 1946; 18,619.

4 - ALLINSON (J.C.) - Colorimetric estimation of Penicillin in aqueous solutions - Proc. Soc. exp. biol. Med. 1945, 60, 293.

5 - ASHESHOW(I.N.), STRELITZ (F.).- A simplified method for the assay of antibiotics - Science, 1945, 101, 621-22.

6 - BABES (V.) - J. Connaiss. Med. Prat. 1885, 7, 321.

7 - BARNES (R.B.), GORE (R.C.), WILLIAMS (E.F.), LINSLEY (S. G.), PETERSEN (E.M.) - Infra red analysis of crystalline Penicillin - Anal. Chem. 1947, 19, 620-27.

8 - BOYMOND (P.) - Le dosage chimique de la Pénicilline dans les médicaments galéniques et une nouvelle méthode de microdosage biologique - Pharm. Acta Hely, 1947, 22, 353-58.

9 - BEADLE (F.W.), METCHELL (H.K.), BONNER (D.) - Improvements in the cylinder plate method for Penicillin assay - J. Bact. 1945, 49, 101-104.

10 - BENEDICT (R.G.), SCHMIDT (W.H.), COGHILL (R.D.), OLESON (A.P.) Penicillin - III - The stability of Penicillin in aqueous solution - J. Bact. 1945, 49, 85-95.

11 - BENOIST (D.) - Précisions apportées à la méthode de titrage microbiologique par dilutions de la Pénicilline - Ac. Phie, Séance du 2/4/1947.

12 - BIGGER (J.W.) - Inactivation of Penicillin by serum - Lancet, 1944, 2, 400, 2.

13 - BIGGER (J.W.).- Treatment of staphylococcal infections with Penicillin by intermittent sterilisation, Lancet 1944 2, 497 - 500.

14 - BIRKINSHAW (J.H.), RAISTRICK (H.).- Notatin. An antibacterial glucose aerodehydrogenase from Penicillium notatum Westling - J. Biol. Chem, 1943, 148, 459-60.

15 - BONET MAURY (P.).- Etude du titrage de la Pénicilline : méthode des dilutions - Ann. Inst. Past. 1946, 72, 966-72.

16 - BOUCHARD (C.).- C.R. Ac. Scie. Paris, 1889, 108, 713.

17 - BRINDLE (H.), KEEPE (W.G.).- Hygroscopicity of commercial Penicillin.- Chem. Drug. 1947, 148, 352 - Pharm. J. 1947, 159, 203-4.

18 - BROCH (P.), KERHARO (J.), NETIK (J.).- La Pénicilline - Dosages. Paris 1945 Vigot Ed. 1 vol.

19 - BRODIE (J.).- A simple and convenient method for the assay of Penicillin. J. Path. and Bact. 1945, 57, 257.

20 - VAN BRUGGEN (J.R.), REITHEL (F.J.), CAIN (C.K.), KATZMANN (P.A.), DOISY (E.A.), MUIR (R.D.), ROBERTS (E.C.), GABY (W.H.), HOMAN (D.M.), JONES (L.R.).- Penicillin B : preparation, purification and mode of action. J. Biol. Chem. 1943, 148, 365-78.

21 - BRUYNORGHE (R.).- Mode d'action de la Pénicilline. Revue Méd. de Louvain 1945, 4, 49-55.

22 - BUGGS (C.E.).- The presence in normal serum of inhibiting substances against B. subtilis - Science 1946, 103, 363.

23 - CARR (C.), RIDDICK (J.A.).- Hygroscopicity of Penicillin salts - Indust. Eng. Chem. 1947, 39, 1021-23.

24 - CATANI (A.).- G. Int. Scie. Med. 1885, 7, 493.

25 - CHABBERT (Y.), SUREAU (B.).- Microdosage chimique des antibiotiques - Adaptation à une méthode dérivée de la slide cell de la technique glucose PSP. Ann. I.P. 1947, 73, 1130-32.

26 - CHABBERT (Y.), SUREAU (B.).- Titrage de la Streptomycine dans le sang et le liquide céphalo rachidien.- Ann. I.P. 1947, 73, 1142-44.

27 - CHANDLER (V.L.), PRICE (C.W.), RANDALL (W.A.) - Control and evaluation of blood serum assays for Penicillin. Science 1945, 102, 355-56.

28 - CHOLDEN (L.S.).- A simplified technique for the agar cup assay of Penicillin.- J. Bact. 1944, 47, 402-3.

29 - COLEBROOK (L.), STORER (E.J.), WRIGHT (A.E.).- New principles in therapeutic inoculation - Lancet 1923, I, 365, 72 et 417-20.

30 - COOKE (J.V.) - A simple clinical method for the assay of Penicillin in body fluids and for the testing of Penicillin sensitivity of Bacteria. J. Am. Med. Ass. 1945, 127, 445-9.

31 - COULTHARD (C.E.), SHORT (W.F.), SKRIMSHIRE (F.H.), BIRKINSHAW (J.H.), MICHAELIS (R.), SKYES (G.), STANDFAST (F. B.), RAISTRICK (H.).- Notatin Penicillin A. An antibacterial gluco aero dehydrogenase from Penicillium notatum Westling - Nature 1942, 150, 634-35.

32 - CURRAN (H.R.), EVANS (F.R.) - Penicillin as a sporicidal agent - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1945, 58, 263.

33 - DEUSTON (R.), The stability of Penicillin solutions - Pharm. J. 1946, 157, 71.

34 - DEUSTON (R.), LEES (K.A.).- The stability of Penicillin solutions. Quart. J. of Pharm. and Pharmacol. 1946, 19, 322.

35 - DOEHLE - Habilitationschr. Kiel 1889.

36 - DOLKART (R.E.), DEY (F.D.), SCHWENLEIN (G.X.) - Penicillin assay technique - A comparative study - J. Bact. 1947, 53, 17-24.

37 - DONOVICK (R.), LAPEDES (D.), PANSY (F.).- Studies on the quantitative differential analysis of mixtures of several essentially pure Penicillin types - J. Bact. 1947, 54, 425-42.

37 bis - DUCHESNE (E.).- Thèse de médecine - Lyon 1897.

38 - EAGLE (H.).- J. exp. Med. 1947, 85, 141.

39 - ELIAS (W.F.), MERRION (H.S.), SPEICHER (T.).- Inhibiting factors in the determination of Penicillin in human sera Science 1945, 102, 223 - 25.

40 - EMMERICH (R.), LOW (O.).- Z. Hyg. Infektkr. 1889, 31, 1.

41 - EPSTEIN (J.A.), FOLEY (E.J.), LEE (S.W.).- The effect of Penicillin on experimental Streptococcus, Pneumococcus and Staphylococcus infections of the egg embryo.- J. Bact. 1944, 47, 573-74.

42 - EPSTEIN (J.A.), FOLEY (E.J.), PERRINE (J.), LEE (S.W.).- Convenient assay method for Penicillin and similar substances. J. Lab. Clin. Med. 1944, 29, 319-20.

43 - FIELDING (J.).- A simple method of estimating Penicillin and other bacteriostatics. Brit. Med. J. 1947, I, 136-7.

44 - FISCHBACH (H.).- The separation of Penicillin by partition chromatography.- J. Am. Pharm. Ass. 1947, 36, 220-23.

45 - FLEMING (A.).- An antibacterial action of culture of Penicillium with special reference to their use in isolation of Bacillus influenzae.- Journ. Ex. Path. 1929, 10, 226 - 36.

45 bis - FLEMING (A.).- In vitro test of Penicillin potency - Lancet 1942, I, 732-33.

46 - FLEMING (A.).- Streptococcal meningitis treated with Penicillin. Measurement of bacteriostatic power of blood and cerebrospinal fluid.- Lancet 1943, 2, 434-38.

47 - FLEMING (A.).- Micromethods of estimating Penicillin in blood serum and other body fluids. Lancet 1944, 2, 620-21.

48 - FLEMING (A.).- Micromethods of estimating Penicillin in blood serum and other body fluids.- Am. J. Chem. Path. 1945, 15, 1-6.

49 - FLEMING (A.), FLOREY (H.W.), BODENHAM (D.C.), CUTLER (E. C.), HUDSON (R.V.), CHRISTIE (R.V.), JEFFREY (J.S.), ROBINSON (J.N.).- Discussion on Penicillin. Proc. Roy. Soc. Med. 1944, 37, 101-112.

50 - FLEMING (A.), SMITH (C.).- Estimation of Penicillin in serum. Use of glucose, Phenol red, and serum water. Lancet 1947, 252, 401-2.

51 - FLOREY (H.W.), FLOREY (M.E.).- General and local administration of Penicillin.- Lancet 1943, I, 387-97.

52 - FLOREY (H.W.), JENNINGS (M.A.).- Some biological properties of highly purified Penicillin- Brit. J. Exp. Path. 1942, 23, 120-23.

53 - FORD (J.H.).- Hydroxylamine method of determining Penicillin. Anal. Chem. 1947, 19, 1004-6.

54 - FOSTER (J.W.).- Quantitative estimation of Penicillin.- J. Biol. Chem. 1943, 144, 285-86.

55 - FOSTER (J.W.), WILKER (B.L.) - Microbiological aspect of Penicillin. II - Turbidimetric studies of Penicillin inhibition - J. Bact. 1943, 46, 377-86.

56 - FOSTER (J.W.), WOODRUFF (H.B.).- Microbiological aspect of Penicillin. I. Methods of assay. J. Bact. 1943, 46, 187-202.

57 - FOSTER (J.W.), WOODRUFF (H.B.).- Microbiological aspect of Penicillin. VI. Procedure for the cup assay for Penicillin.- J. Bact. 1944, 47, 43-58.

58 - GALLARDO (E.) - Sensivity of Bacteria from infected wounds to Penicillin. II. Methods of assay - War. Med. 1944, 6, 86-91.

59 - GARDNER (A.D.).- Morphological effects of Penicillin on Bacteria - Nature 1940, 146, 837-38.

60 - GARDNER (A.D.).- Microscopical effects of Penicillin on spores and vegetative cells of Bacilli.- Lancet 1945, I, 658-9.

61 - GARRE (C.).- Correspondenz-blatt fur Schweizer Aerzte 1887 17, 385.

62 - GARROD (L.) - The Laboratory control of Penicillin treatment. Brit. Med. J. 1944, 1, 528-30.

63 - GOODALL (R.R.), LEVI (A.A.).- A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different Penicillins in a mixture.- Nature 1946, 158, 675-76.

64 - GOODALL (R.R.), LEVI (A.A.).- A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different Penicillins in a mixture.- The Analyst 1947, 72, 277-89.

65 - GOSIO (B.).- Rivesta d'Igiene e Sanita Publica 1896, 825.

66 - GOTH (A.), BUSH (M.T.).- Rapid method for estimation of Penicillin.- Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1944, 16, 541-2.

67 - GOTS (J.S.), GLAZER (A.M.).- Stability and activity of Penicillin in solution and in ointment - War. Med. 1945, 7, 168-9.

68 - GOYAN (F.M.), DUFRENOY (J.) - A graphical calculator for bio assays - J. Am. Pharm. Ass. 1947, 36, 305-8.

69 - GOYAN (F.M.), DUFRENOY (J.), STRAIT (L.A.), PRATT (R.), A three hour "physical development" cup plate assay for Penicillin - J. Am. Pharm. Ass. 1947, 36, 65-68.

70 - GRATIA (A.) - C.R. Soc. Biol. 1925. 93, 1040.

71 - GRATIA (A.) - Ann. I.P. 1932, 48, 413.

72 - GRATIA (A.), Bull. Ac. Roy. Med. Belg. 1934, 14, 285.

73 - GRATIA (A.) - Application de la culture sur cellophane à l'étude et à la production des antagonismes microbiens C.R. Soc. Biol. 1944 - 138, 893.

74 - GRATIA (A), DATH (S.).- C.R. Soc. Biol. 1924, 91, 1442.

75 - GRATIA (A.), DATH (S.) - C.R. Soc. Biol. 1925, 92, 461 et 1125.

76 - GREEN (C.A.).- J. Path. and Bact. 1946, 58, 559.

77 - GRENFELL (T.G.), MEANS (J.A.), BROWN (E.K.) - Studies on the naturally occuring Penicillin. An assay method for Penicillin G. - J. Biol. Chem. 1947, 170, 527-35.

78 - HAHN (L.).- Stabilisation of Penicillin solutions with sodium citrate. Lancet, 1947, 252, 408-10.

79 - HAHN (L.).- Stabilisation of Penicillin salt solutions with sodium citrate. Nature 1947, 160, 639.

80 - HALLIWELL (G.).- Stability of Penicillin in aqueous solutions. Nature 1947, 159, 747-48.

81 - HARPER (G.J.), CAWSTON (W.C.) - La détermination in vitro de la sensibilité des bactéries aux sulfonamides - J. Path. Bact. 1945, 57, 59-66.

82 - HARTLEY (P.).- The importance of International Biogical standards in Pharmacy - Pharm. J. 1946, 217, 19.

83 - HAYES (W.).- The effect of agar depth in the plate method for the assay of Penicillin. - J. Path. and Bact. 1945, 57, 457.

84 - HEATLEY (N.G.).- A method for the assay of Penicillin - Biochem. J. 1944, 38, 61-65.

85 - HEATIEY (N.G.).- A simple plate method for multiple tests of the antibacterial activity of many Bacteria against other bacterial Strains.- J. Gen. Microb. 1947, I, 168-70.

86 - HEATLEY (N.G.).- An introductory survey.- The analyst, 1948, 73, 244-47.

87 - HEILMAN (D.H.).- A method of standardizing Penicillin, Am. J. Med. Scie. 1944, 207, 477-83.

88 - HEILMAN (D.H.), HERREL (W.E.).- Comparative antibacterial activity of Penicillin and Gramicidin in tissue culture studies.- Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. 1942, 17, 321-27.

89 - HEILMANN (D.H.), HERREL (W.E.).- The use of Fleming's modification of the Wright slide-cell technique for determining Penicillin in body fluids. Am. J. Clin. Path. 1945, 15, 7-9.

90 - HERREL (W.E.), HEILMAN (D.H.).- Comparative bacteriostatic activity of Penicillin and Gramicidin. J. Bact. 1942, 43, 12-13.

91 - HERREL (W.E.), HEILMAN (D.H.).- Tissue culture studies on cytotoxicity of bactericidal agents. III - Cytotoxic and antibacterial activity of Gramicidin and Penicillin - comparison with other germicides. Am. J. Med. Scie. 1943, 206 221-26.

92 - HERREL (W.E.), NICHOLS (D.R.), HEILMAN (D.H.).- Penicillin, its usefulness, limitation, diffusion and detection with analysis of 150 cases in which it was employed. J. Am. Med. Ass. 1944, 125, 1003-11.

93 - HERRIOT (R.M.).- J. Biol. Chem. 1946, 164 - 725.

94 - HIGUCHI (K.), PETERSON (W.H.).- Estimation of types of Penicillin in broths and finished products. A microbiological method. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1947, 19, 68-71.

95 - HIRSCH (J.).- Etudes sur la Pénicilline in vitro - Mécanisme d'action. C.R. Soc. Turque Sci. Phys. et Nat. 1943. 1944, 12,25.

96 - HIRSCH (J.).- Les bases du test manométrique de la Pénicilline. Hyg. Institut des Universität Istanbul.- C.R. Annuel et archives Soc. turque Scie Phys. et Natur.

97 - HOBBY (G.L.), DAWSON (M.H.).- Bacteriostatic action of Penicillin on hemolytic Streptococci in vitro. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1944, 56 - 178-81.

98 - HOBBY (G.L.), DAWSON (M.H.).- Effect of rate of growth of Bacteria on action of Penicillin. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1944, 56, 181-4.

99 - HOBBY (G.L.), MEYER (K.), CHAFFEE (E.).- Activity of Penicillin in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1942, 50, 277-80.

100 - HOLMES (L.F.), LOCKWOOD (J.S.).- Studies on bioassay of Penicillin. Am. J. Med. Scie. 1944, 207, 267-8.

101 - HONL (J.), BUKOWSKY (J.).- Zbl. Bakt. 1 Abt. 1899, 26, 305.

102 - HOYT (R.E.), GJELHAUG - LEVINE (M.).- A method for determining sensivity to Penicillin and Streptomycin. Science 1947, 106, 171.

103 - JACKSON (R.).- Note sur le titrage de la Pénicilline par la méthode des dilutions en bouillon.- Bull. Org. Hyg. SDN - 1945-46, 12, 312-15.

104 - JACKSON (W.), FOSTER (J.W.), WOODRUFF (H.B.).- Modification dans l'attribution d'une valeur à la Pénicilline par la méthode des cupules. J. Biol. Chem. 1943, 148, 723.

105 - JANOT (M.M.).- Substances antimicrobiennes d'origine fongique.- Bull. Soc. Chim. Biol. 1944, 26, 16-39.

106 - JANSEN (E.F.), HIRSCHMAN (D.J.).- Subtilin, an antibacterial product of Bacillus subtilis. Culturing conditions and properties. Arch. Bio. Chem. 1944, 4, 297-309.

107 - JOHNSON (B.A.), ANKAR (H.), MELENEY (F.L.) - Bacitracin a new antibiotic produced by a member of the Bacillus subtilis group. Science 1945, 102, 376-377.

108 - JOSLYN (D.A.).- Penicillin assay outline of four hours turbidimetric method. Science 1944, 99, 21-2.

109 - JOSLYN (D.A.), GALBRAITH (M.).- A turbidimetric method for the assay of antibiotics. J. Bact. 1947, 54, 26.

110 - KAVANAGH (F.).- A qualitative test for Penicillin. Science 1947, 105, 189.

111 - KIESE (M.).- Chimiothérapie des substances antimicrobiennes provenant des champignons inférieurs et des bactéries. Klin. Wooh. 1943, 22, 505-11.

112 - KIMMELSTIEL (P.) - Med. Klinik 1924, 20, 149.

113 - KING (J.T.).- Arch. f. Exp. Zellforsch 1930, 9, 341.

114 - KING (J.T.).- Arch. F. Exp. Zellforsch 1937, 20, 208.

115 - KING (J.T.), HENSCHEL (A.F.), GREEN (B.S.).- Influence of Protonsil soluble on Beta Hemolytic Streptococci growing in tissue culture media.- Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1938, 38, 810.

116 - KIRBY (W.M.M.).- Stability of Penicillin solutions at room and incubation temperature. J. Am. Med. Ass. 1944, 125, 628.

117 - KIRBY (W.M.M.).- Propriétés d'un inactivateur de Pénicilline extrait d'un Staphylocoque pénicillino-résistant. J. Clin. Invest. 1945, 24, 170 - 4.

118 - KIRBY (W.M.M.), RANTZ (L.A.).- Methods of measuring Penicillin concentrations in body fluids. J. Bact. 1944, 48, 603-8.

119 - KNOX (R.).- Effect of Penicillin on cultures in liquid and solid media. Lancet 1945, 1, 559-61.

120 - KOCHOLATY (W.).- Cultural characteristics of Penicillium notatum Westling in relation to the production of antibacterial substances. Indication of the dual nature of the antibacterial substance. J. Bact. 1942, 44, 469-77.

121 - KOCHOLATY (W.).- Purification and properties of Penatin, the second antibacterial substance produced by Penicillium notatum Westling. Science 1943, 57, 186-87.

122 - KOCHOLATY (W.).- Purification and properties of Penatin, the second antibacterial substance produced by Penicillium notatum Westling. Arch. Bio. Chem. 1943, 2, 73-86.

123 - KONIKOVA (A.S.), MAZARKH (R.), BLINNIKOWA (E.I.), DOBBERT (N.N.). Propriétés biochimiques de bactéries génératrices de Gramicidine. Microbiology URSS 1944, 13, 171-79.

124 - KNUDSEN (L.F.).- Penicillin assay. Science,1945, 101, 46 -8.

125 - LEE (S.W.), FOLEY (E.J.), EPSTEIN (J.A.). Mode of action of Penicillin. J. Bact. 1944, 48-393.

126 - LEE (S.W.), FOLEY (E.J.), EPSTEIN (J.A.), WALLACE (J.H.) Improvement in the turbidimetric assay for Penicillin. J. Biol. Chem. 1944, 152, 485-6.

127 - LESSIAU (J.).- Etude de la précision des méthodes de titrage de la Pénicilline. Ann. Inst. Past. 1946, 72, 835.

128 - LEVADITI (C.).- La mycothérapie des infections microbiennes. Presse Med. 1944, 52, 129-30.

129 - LEVADITI (C.).- Mode d'action de la Pénicilline. Presse Med. 1945, 53, 69.

130 - LEVADITI (C.).- La Pénicilline et ses applications thérapeutiques. 1 vol. 1945.

131 - LEVADITI (C.), PENAU (H.), PERAULT (R.), ERICHSEN (M.L.). Sur un principe staphylolytique élaboré par une variété de Penicillium (Penicillium notatum ?).- C.R. Soc. Biol. 1943, 137, 359-60.

132 - LEVADITI (C.), PENAU (H.), PERAULT (R.), ERICHSEN (M.L.), BENOIST (D.).- Nouvelles constatations concernant le principe staphylolytique secrété par le Penicillium Corylophilum Thom. C.R. Soc. Biol. 1944, 138, 5-7.

133 - LIESKE (R.).- Morphologie und Biologie der Strahlenpilze. Borntrager Leipzig 1921.

134 - LOCHHEAD (A.G.), TIMONIN (M.).- The effect of glucose on Penicillin potency tests. Canad. J. Pub. Health. 1943, 34 236-40.

135 - MAC GUIRE (J.M.).- La méthode du disque de papier filtre dans le titrage des antibiotiques. J. Bact. 1945, 50, 717.

136 - MAC KEE (C.M.), HOUCK (C.L.).- Induced resistance to Penicillin of cultures of Staphylococcus, Pneumococcus, and Streptococcus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1943, 53, 33-4.

137 - MAC KEE (C.M.), RAKE (G.), MENZEL (A.E.O.).- Studies on Penicillin. J. Imm. 1944, 48, 259-69.

138 - MAC MAHAN (J.R.).- An improved short time turbidimetric assay for Penicillin. J. Biol. Chem. 1944, 153, 249-58.

139 - MANN (S.M.).- Turbidimetric determination of Penicillin potency. Rev. Inst. Salubridad enfermedad top. (Mex.).- 1944, 5, 43-51.

140 - MEYER (K.), CHAFFEE (E.), HOBBY (G.L.), DAWSON (M.H.), SCHAWEN (K.E.), FLEISCHER (G.). On Penicillin. Science 1942, 96, 20-21.

141 - MILLER (C.P.), FOSTER (A.Z.).- Studies on the action of Penicillin. III Bactericidal action of Penicillin on Meningococcus in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1944, 56, 205-8.

142 - MOLINAS (S.A.), WALCH (H.). The stability of commercial crystalline sodium Penicillin in solution. J. Am. Pharm. Ass. 1947, 36, 41-47.

143 - MORICE (E.), TISSERAND (M.), REBOUL (J.).- Méthodes statistiques en médecine et en biologie. 1 vol. Masson, ed. 1947.

144 - MORLEY (D.C.).- A simple method of testing the sensivity of wound bacteria to Penicillin and sulphathiazole by the use of impregnated blotting-paper discs. J. Path. Bact. 1945, 57, 379-382.

145 - MUCH (H.).- Munch. Med. Wschr. 1925, 72, 374.

146 - MUNDELL (M.), FISCHBACH (H.), EBLE (T.E.). The chemical assay of Penicillin. J. Am. Pharm. Ass. 1946, 35, 373.

147 - MURTAUGH (J.J.), LEVY (G.B.).- Chemical method for the determination of Penicillin. J. Am. Chem. Soc. 1945, 67, 1042.

148 - NICOLLE (M.), Ann. I.P. 1907, 21, 613.

149 - NITTI (F.).- Un nouveau traitement des infections microbiennes par un produit élaboré par des moisissures : la Pénicilline. Progrès Med. 1944, 1, 10-12.

150 - NITTI (F.), FOSSAERT (J.), FAGUET (M.). Recherches sur l'activité antistaphylococcique et le mode d'action de la Pénicilline. Ann. Inst. Past. 1944, 70, 80.

151 - OSGOOD (E.E.).- Assay of Penicillin, Streptomycin, Trivalent organic Arsenicals and other bactericidal and bacteriostatic agents. A Technique based on an original application of mathematical principles with adaptations for all assay purposes. J. Lab. Clin. Med. 1947, 32, 444 - 60.

152 - OSWALD (E.J.), RANDALL (W.A.).- A cylinder guide for use in plate assay of Penicillin. Science, 1945, 101, 99-100.

153 - PASTEUR (L.), JOUBERT (J.).- Charbon et septicémie. C.R. Ac. Scie. 1877, 85, 101-115.

154 - PENAU (H.), HAGEMANN (G.), Essais d'extraction d'une substance bactéricide d'origine fongique. C.R. Soc. Biol. 1943, 137, 724-25.

155 - PENAU (H.), LEVADITI (C.), HAGEMANN (G.).- Essai d'extraction d'une substance bactéricide d'origine fongique. C.R. Soc. Chim. Biol. 1943, 25, 406-10.

156 - PENAU (H.), LEVADITI (C.), PERAULT (R.), ERICHSEN (M.L.). Propriétés du principe staphylolytique élaboré par le Penicillium notatum Westling. C.R. Soc. Biol. 1943, 137, 592.

157 - PENAU (H.), SIMONNET (H.).- Règles générales de l'essai biologique des médicaments.- J. Pharm. Chim. 1932, 15, 116-151.

158 - POPE (C.G.).- The assay of Penicillin by the dilution method and the differential assay of Penicillin by Charcoal adsorption. The Analyst 1948, 73, 247-50.

159 - POPE (C.G.), STEVENS (M.).- Le titrage de la Pénicilline par la méthode des dilutions. Bull. Org. Hyg. SDN. 1945, 46, 12, 289-98.

160 - PRATT (R.).- Influence of phosphates on stability of partially purified Penicillins. J. Am. Pharm. Ass. 1947, 36, 69-72.

161 - PRATT (R.).- Stabilisation of Penicillin in aqueous solutions by low concentrations of phosphates. Nature 1947 159, 233-35.

162 - PRATT (R.), DUFRENOY (J.).- Practical three hours and two hours cylinder plate assays for Penicillin. Nature 1947, 159, 576.

163 - PREVOT (A.R.).- Méthode de titrage rapide de la Pénicilline par inhibition du pouvoir réducteur de W. perfringens sur le vert Janus. Ann. Inst. Past. 1946, 72, 471.

164 - PREVOT (A.R.), PEYRE (M.), DIGEON (M.).- Modifications de la méthode de titrage rapide de la Pénicilline. Ann. Inst. Past. 1946, 72, 840.

165 - PULVERTAFT (R.V.), YUDKIN (J.).- Stabilisation of Penicillin by phosphate. Nature 1945, 156, 82.

166 - RAKE (G.), JONES (H.).- A rapid method for estimation of Penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1943, 54, 189-90.

167 - RAKE (G.), JONES (H.), MAC KEE (C.M.).- Antiluminescent activity of antibiotic substances. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1943, 52, 136.

168 - RAKE (G.), MAC KEE (C.M.), JONES (H.).- A rapid test for the activity of certain antibiotic substances. Proc. Soc. Exp. Med. 1942, 51, 273-4.

169 - RAMMELKAMP (C.H.).- A method for determining the concentration of Penicillin in body fluids and exsudates. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1942, 51, 95-97.

170 - RAMMELKAMP (C.H.), KEEFER (C.S.).- The absorption, excretion and distribution of Penicillin. J. Clin. Invest. 1943, 22, 425-27.

171 - RAMMELKAMP (C.H.), MAXON (T.).- Resistance of Staphylococcus aureus to the action of Penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1942, 51, 386-89.

172 - RAMON (C.), RICHOU (R.).- Les propriétés antidotiques des filtrats de culture de Penicillium notatum. Stabilité des solutions de Pénicilline formolées. Lyon Pharm. 1946 11-12, 33-36.

173 - RAMON (G.), RICHOU (R.), RAMON (J.).- De l'antagonisme microbien, III. Les filtrats de Penicillium notatum et les solutions de Pénicilline. Rev. Imm. Therap. Antim. 1946, 10, 125-47.

174 - RAMON (G.), RICHOU (R.), RAMON (P.).- De l'antagonisme microbien en général et en particulier des propriétés antagonistes des filtrats de culture de B. Subtilis à l'égard de certaines bactéries et des toxines microbiennes. Rev. Imm. 1944-45, 9, 161-217.

175 - RANDALL (W.A.), PRICE (C.W.).- A rapid method for estimating the bacteriostatic activity of desinfectants. J. Lab. Clin. Med. 1944, 29, 312-13.

176 - RANDALL (W.A.), PRICE (C.W.), WELCH (H.).- The estimation of Penicillin in body fluids. Science 1945, 101, 365-6.

177 - RANDALL (W.A.), WELCH (H.), PRICE (C.W.).- The effect of serum and organ emulsions on Penicillin fractions. J. Am. Pharm. ass. 1947, 36, 17-19.

178 - RANTZ (L.A.), KIRBY (W.M.M.).- The action of Penicillin on the Staphylococcus in vitro. J. Imm. 1944, 48, 335-42.

179 - RAPER (K.B.), FENNEL (D.I.).- The production of PenicillinXin submerged cultures. J. Bact. 1946, 51, 761.

180 - REID (R.D.), BREWER (J.H.).- The reductase method for the determination of Penicillin concentration in body fluids. J. Bact. 1946, 52, 251-54.

181 - REGNIER (J.), LAMBIN (S.), SZOLLOSI (E.).- I - Données générales sur la mesure, le calcul et l'expression du pouvoir toxique des substances médicamenteuses. J. Physio. Patho. Gén. 1937, 35, 329-47.

182 - REGNIER (J.), LAMBIN (S.), SZOLLOSI (E.).- V. Données générales sur la mesure, le calcul et l'expression du pouvoir toxique des substances médicamenteuses. J. Physio. Patho. Gén. 1937, 35, 950 - 68.

183 - RIDER (B.F.), MELLON (M.G.).- Colorimetric determination of nitrites. Ind. Eng. Chem. 1946, 18, 96.

184 - ROBERTS (E.C.), CHAIN (E.), MUIR (R.D.), REITHEL (F.G.), GABY (W.L.), VAN BRUGGEN (J.T.), HOMAN (D.M.), KATZMAN (P.A.), JONES (L.R.), DOISY (E.A.).- Penicillin B, an antibacterial substance from Penicillium notatum. J. Biol. Chem. 1943, 147, 47-58.

185 - ROSENBLATT (P.), ALTURE - WERBER (E.), KASHDAN (F.), LOEWE (L.). A method for the determination of Penicillin in body fluids. J. Bact. 1944, 48, 599 - 601.

186 - ROSENTHAL (L.).- C.R. Soc. Biol. 1925, 92, 78 et 472.

187 - RUMPF (T.). Dtsch Med. Wschr. 1893, 19, 987.

188 - SALLE (A.J.), JANN (J.G.).- Subtilin,antibiotic produced by Bacillus subtilis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1946, 61, 232.

189 - SANCHEZ (G.), LAMENSANS (A.).- Méthode de dosage rapide de la Pénicilline et de la Streptomycine. C.R. Ac. Scie. 1947, 224, 1189 - 91.

190 - SARTORIUS.- Zbl. Bakt. 1 abt. Orig. 1924, 93, 162.

191 - SCHILLER (I.).- Zbl. Bakt. 1 Abt. Orig. 1924, 91, 68.

192 - SCHMIDT (W.H.), MOYER (A.J.).- Penicillin - I - Method of assay. J. Bact. 1944, 47, 199-208.

193 - SCHMIDT (W.H.), WARD (G.E.), COGHILL (R.D.).- Penicillin VI. Effect of dissociation phases of Bacillus subtilis on Penicillin assay. J. Bact. 1945, 49, 411 - 12.

194 - SCHNITZER (R.J.), CAMAGNI (L.Y.) BUCK (M.).- Resistance of small colony variants (G forms) of a Staphylococcus towards the bacteriostatic activity of Penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1943, 53, 75-8.

195 - SCUDI (J.V.).- A colorimetric method for the determination of Penicillin.- J. Biol. Chem. 1946, 164, 183-94.

196 - SCUDI (J.V.), JELINEK (V.C.).- A rapid micromethod for the fluorometric determination of Penicillin. J. Biol. Chem. 1946, 164, 195-201.

197 - SHEEHAN (J.C.), MADER (W.J.), CRAM (D.S.).- A chemical assay method for Penicillin G. - J. Am. Chem. Soc. 1946 68, 2407.

198 - SHERWOOD (M.B.), de BEER (E.J.).- Discrepancy in analysis of Penicillin in blood by the Oxford cup method as revealed by the paper disc technique. Science, 1947, 105, 414

199 - SHERWOOD (M.B.), FALCO (E.A.), de BEER (E.J.).- Facteur influençant la vitesse et la précision d'une méthode simple de titrage des substances antibiotiques. Soc. of Am. Bacteriologists, p. 423.

200 - SHERWOOD (M.B.), FALCO,(E.A.), de BEER (E.J.).- A rapid quantitative method for the determination of Penicillin. Science 1944, 99, 247-8.

201 - SMITH (E.L.).- Some aspects of the stability of Penicillin. J. Pharm. and Pharmacol. 1946, 19, 300.

202 - SMITH (L.D.), HAY (T.).- The effect of Penicillin on the growth and morphology of Staphylococcus aureus. J. Franklin Inst. 1942, 233, 598 - 602.

203 - SPINK (W.W.), FERRIS (V.).- Penicillin inhibitor from Staphylococci which have developped resistance to Penicillin in the human body. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1945, 59, 188-90.

204 - SPINK (W.W.), FERRIS (V.).- Quantitative action of Penicillin inhibitor from Penicillin resistant strains of Staphylococcus. Science 1945, 102, 221-23.

205 - SUREAU (B.), DEPIN (F.), SCHURR (O.).- Titrage biologique de la Pénicilline dans le sang et le liquide céphalo-rachidien en présence d'un indicateur de pH. Ann. I.P. 1946 72, 665-67.

206 - TANNER (F.W.), WILSON (F.L.).- Germicidal action of aliphatic alcohols. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1943, 52, 138-40.

207 - THOMAS (A.R.), LEVINE (M.), VITAGLIANO (G.R.). Simplified procedure for ascentaining concentration of and bacterial susceptibility to Penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. 1944, 55, 264-67.

208 - TODD (E.W.).- Bacteriolytic action of Penicillin.- Lancet 1945, 1, 74-8.

209 - TOMPSETT (R.), SCHULTZ (S.), MAC DERMOT (W.).- The relation of protein binding to the pharmacology and antibacterial activity of Penicillin X, G, dihydro F and K. J. Bact. 1947, 53, 581-95.

210 - TURNER (J.C.), HEATH (F.K.), MAGASANIK (B.).- Inhibition of urease by Penicillin.- Nature 1943, 152, 326.

211 - VALLEE (M.).- Etude du pouvoir bacteriolytique du B. subtilis. C.R. Soc. Biol. 1945, 139, 148-9.

212 - VAUDREMER (A.).- C.R. Soc. Biol. 1913, 74, 278 et 752.

213 - VELU (H.), CHABANAS (D.).- Les erreurs de mesures de la Pénicillinémie. Ann. I.P. 1947, 73, 1173-77.

214 - VELU (H.), MAINIL (J.).- Titrage rapide de la Pénicilline par turbidimétrie. C.R. Soc. Biol. 1947, 141, 470-71.

215 - VELU (H.), MAINIL (J.).- Technique turbidimétrique appliquée au contrôle de la production de la Pénicilline. Ann. I.P. 1947, 9, 870-8.

216 - VELU (H.), PENAU (H.), BENOIST (D.).- Action du pH sur l'activité bactériostatique de la Pénicilline. Bull. Ac. Med. 1946, 130, 141.

217 - VELU (H.), PENAU (H.), CHABANAS (D.), BENOIST (D.).- Filtrats bruts de Pénicilline stabilisés à usage externe. Ac. Med. Séance du 26/3/1946.

218 - DU VIGNEAUD (V.), CARPENTIER (F.H.), HOLLEY (R.W.), LIVERMORE (A.H.), RACHELE (J.R.).- Science 1946, 104, 431.

218 bis - DU VIGNEAUD (V.).- Pénicilline synthétique - 11ème Congrès chimie pure et appliquée. Londres 17-24 Juillet 1947.

219 - VINCENT (L.M.).- Modifications de la méthode de Fleming pour l'essai des substances antibiotiques. Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29, 840.

220 - VINCENT (J.G.), VINCENT (H.W.).- Filter paper discs modification of the Oxford cup Penicillin determination. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1944, 55, 162 - 4.

221 - VUILLEMIN (P.).- Ass. Fr. Av. Scie. 1889 - 2ème partie - 525.

222 - WAKSMAN (S.A.).- Microbial antagonisms and antibiotic substances. 1 vol. The commonwealth fund N.Y.

223 - WAKSMAN (S.A.), REILLY (C.).- Agar streak method for assaying antibiotic substances. Ind. Eng. Chem. 1945 - 17, 556.

224 - WAKSMAN (S.A.), REILLY (H.C.).- Méthode rapide de titrage de la Pénicilline produite par diverses souches de Penicillium notatum. J. Bact. 1944, 47, 308.

225 - WHITE (P.B.).- Le titrage de la Pénicilline par la méthode des gouttelettes sur plaque. Bull. Org. Hyg. SDN - 1945-46, 12, 299-311.

226 - WILKINS (W.H.), HARRIS (G.C.M.).- Investigations into the production of bacteriostatic substances by fungi. II - A method for estimating the potency and specificity of the substance produced. Ann. Applied. Biol. 1943, 30, 226 - 29.

227 - WILSON (U.).- A new rapid method for Penicillin assay. Nature 1943, 152, 475-76.

227 bis - WINSTEN (W.R.), SPARK (A.H.).- Penicillin type produced by Penicillium chrysogenum Q 176 - Science 1947, 106, 192-3.

228 - WOLOHAM (M.B.), CUTTING (W.C.), CUTTING (M.W.).- Estimation of Penicillin in blood and other body fluids. J. Lab. Clin. Med. 1945, 30, 161-2.

229 - WOOLEY (J.), SCHMIDT (H.).- Clinical Penicillin assay : an adaptation of the Fleming agar hole method. Am. J. Clin. Path. 1945, 9, 22-6.

230 - WRIGHT (A.E.).- New principles in therapeutic inoculation Lancet 1923, I, 365-72.

231 - WRIGHT (W.W.), GROVE (D.C.).- Estimation de la Pénicilline K dans les Pénicillines commerciales. J. Am. Pharm. Assoc. 1948, 37, 115.

232 - YOUMANS (G.P.), WILLINSTON (E.H.), SIMON (M.).- Production of small colony variants of Staphylococcus aureus by the action of Penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1945, 58 , 56-7.

233 - ZUKERMANN (I), MINKEWITSCH (I).- Zbl. Bakt. 1925-26, 80, 483.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIER CHAPITRE - LES ANTIBIOTIQUES - GENERALITES 3

I - DEFINITION 3
II - HISTORIQUE 3
III - TITRAGE D'UN ANTIBIOTIQUE 5

SECOND CHAPITRE - LES METHODES DE TITRAGE DE LA PENICILLINE 9

I - DIFFERENTES METHODES DE TITRAGE 9

A - Méthodes basées sur l'inhibition de la culture d'un germe 9

1°) Inhibition d'une culture in vitro - sur milieux ordinaires 10

a) Milieux solides 10
- Diffusion à partir du champignon .. 10
- Diffusion du liquide disposé dans une gouttière 11
- Diffusion du liquide disposé dans un cylindre 11
- Diffusion du liquide imprégnant des disques de papier filtre 13
- Diffusion du liquide placé dans une cupule creusée dans la gélose 14
- Méthode des gouttelettes sur plaque 14
- Méthode officielle américaine (F.D.A.) 15
- Méthode de BRODIE 15

b) Milieux liquides 16

1°) Inhibition appréciée à l'oeil nu. 16
- Méthode d'OXFORD 16
- Méthode au Lactobacillus bulgaricus 16

2°) Inhibition appréciée au photomètre 17
- Méthode de S.A. MANN 17
- Méthode de D.A. JOSLYN 17
- Méthode de J.R. MAC MAHAN 17
- Méthode de S.W. LEE 17
- Méthode de VELU et MAINIL 18

2°) Inhibition d'une culture in vitro - sur milieu de culture de tissus - Méthode de D.H. HEILMAN 18

3°) Inhibition d'une culture in vivo sur oeuf embryonné 19

B - Méthodes basées sur l'inhibition de l'activité physiologique d'un germe 19

1°) Inhibition du pouvoir hémolytique 20

2°) Inhibition de la respiration 22

3°) Inhibition du pouvoir réducteur du Staphylocoque 23

- Inhibition de la réduction des nitrates. 23

4°) Inhibition du pouvoir réducteur de germes anaérobies 23

5°) Inhibition de la phosphorescence 25

C - Procédés enzymatiques 26

1°) Inhibition de l'uréase par la Pénicilline. 26
2°) Destruction de la Pénicilline par la Pénicillinase 27

D - Méthodes physiques 27

1°) Dosage par polarimétrie 27
2°) Dosage spectrographique en ultra-violet .. 27

E - Méthodes chimiques 27

Méthode iodométrique de J.F. ALICINO 27

F - Méthodes physico-chimiques 28

1°) Méthode colorimétrique de J.C. ALLINSON .. 28
2°) Méthode colorimétrique de J.W. SCUDI 28
3°) Micro-méthode de J.W. SCUDI 28
4°) Méthode colorimétrique de J.H. FORD 29

G - Cas particulier du titrage des humeurs 29

a) Micro-méthodes 29

1°) Méthode de la cellule de A. FLEMING ... 29
2°) Méthode des tubes capillaires 31

b) Macro-méthodes 32

3°) Méthode turbidimétrique 32
4°) Méthode des dilutions 32
5°) Méthode au Streptocoque hémolytique ... 32
6°) Méthode à la réductase 32
7°) Méthode de Y. CHABBERT et B. SUREAU ... 33

H - Titrage différentiel des Pénicillines 33

1°) Dosages spectrographiques
a) en ultra-violet 33
b) en infra-rouge 33

2°) Dosages chimiques 34

a) à la N-éthyl-pipéridine 34
b) par extraction chloroformique 34

3°) Procédés chromatographiques. 34

a) chromatographie sur silice 34
b) chromatographie sur papier filtre 34

4°) Titrage bactériologique 35

II - CRITIQUE RAPIDE DES METHODES EXPOSEES 36

A - Méthodes par diffusion 36
B - Méthodes par dilution 36
C - Méthodes physiques et chimiques 37
D - Procédés enzymatiques 38

III - TITRAGE DE LA PENICILLINE PAR LA METHODE D'OXFORD 38

1°) Principe de la méthode 39
2°) Composition du milieu d'essai 39
3°) Réalisation pratique des dilutions 41
4°) Germe utilisé 42
5°) Lecture de l'inhibition 43
6°) Interprétation du résultat 45
7°) Précision 46

TROISIEME CHAPITRE - RECHERCHES PERSONNELLES 49

I - ELIMINATION DES ANTIMICROBIENS ASSOCIES A LA PENICILINE 50

A - Par extraction des antimicrobiens autres que la pénicilline 50

B - Par extraction de la Pénicilline 55

C - Par destruction dans le milieu des antibiotiques éventuels 59

II - ESSAI DE STABILISATION DES JUS DE CULTURE EN VUE DE LEUR CONSERVATION 63

III - ETUDE DU DOSAGE DE LA PENICILLINE PAR DILUTION, EN UTILISANT LE STAPHYLOCOQUE COMME GERME D'ESSAI . 66

A - Préparation de la réaction 68

1°) Matériel 68

a) Matériel nécessaire à la préparation des tubes de bouillon : 67
- seringue jaugeuse 68
- jaugeur en verre 70
- stockage du bouillon et des solutions 70
- tubes à essai 72

b) Appareillage de préparation et de distribution des solutions 7 73

- pipettes 73
- fioles jaugées 78

c) Incubateur 79

2°) Bouillon de culture 80

a) Recherche d'un milieu de titrage 80
b) Importance du pH du bouillon 87
c) Importance de la stérilisation du bouillon 90

3°) Germe employé 91

4°) Etalon de référence 93

B - Protocole de la réaction 99

1°) Gamme de dilution 99

2°) Préparation de la dilution inconnue 105

a) Cas des produits secs 105
b) Cas des liquides 109

3°) Réaction proprement dite 110

4°) Ensemencement 110

5°) Lecture des résultats 114

a) Durée d'incubation 114
b) Mise en évidence du tube limite 115

6°) Calcul des résultats 115

C - Valeur de la méthode 120

1°) Marges d'application de la méthode 121

2°) Reproductibilité de la méthode 122

3°) Précision de la méthode des dilutions 127

a) Erreur systématique 128
- sur la mesure des volumes des tubes de la réaction 128
- sur la dilution du produit à titrer . 129

b) Calcul du résultat probable, d'après une série de résultats 129
- erreur quadratique moyenne - erreur à craindre sur la moyenne 130
- nombre de déterminations à effectuer par échantillon 135

CONCLUSIONS 138

BIBLIOGRAPHIE 1

IMPRESSION PHOTOMÉCANIQUE
LES PROCÉDÉS DOREL, PARIS